

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Syntéza nových hybridních molekul M1 agonisty  
s inhibitory acetylcholinesterasy**

Diplomová práce

Markéta Kerhartová



Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Hradec Králové 2017

## **PROHLÁŠENÍ**

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové dne 12.5.2017

Markéta Kerhartová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D., svému konzultantovi PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. a také Mgr. Eugenii Nepovimové a Mgr. Kataríně Špilovské za věnovaný čas, trpělivost, ochotu, cenné rady a za zkušenosti, které jsem pod jejich odborným vedením získala.

Dále bych chtěla poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za provedení NMR analýzy a npor. PharmDr. Vendule Šepsové, Ph.D. za stanovení a zhodnocení biologické aktivity.

*Práce byla vypracována za podpory SVV 260 401.*

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Student: Markéta Kerhartová

Vedoucí: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Název diplomové práce: Syntéza nových hybridních molekul M1 agonisty s inhibitory acetylcholinesterasy

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění s komplexní etiologií, postupnou progresí a fatálními důsledky, jehož incidence je celosvětově velmi vysoká. AD postihuje především stárnoucí populaci a manifestuje se postupným úpadkem kognitivních a intelektuálních funkcí. Histopatologické charakteristiky zahrnují přítomnost  $\beta$ -amyloidních neuritických plaků, neurofibrilárních klubek tvořených hyperfosforylovaným proteinem  $\tau$  a atrofii mozkové tkáně. Hladiny některých neurotransmiterů jsou změněny; sníženy v případě acetylcholinu (ACh), zatímco hladiny glutamátu jsou zvýšeny. V současné době se v rámci terapie tohoto onemocnění používají dvě farmakologické skupiny léčiv: inhibitory acetylcholinesterasy (AChEIs) a antagonisty *N*-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDARs) – memantin. Obě skupiny působí pouze symptomaticky, a tak nezastavují progresi onemocnění. Cílem diplomové práce bylo připravit sérii nových hybridních molekul spojujících AChEIs, konkrétně takrin, 7-methoxytakrin a 6-chlortakrin, s molekulou BQCA – pozitivním alosterickým modulátorem M1 subtypu muskarinového ACh receptoru (mAChRs). Inhibiční účinnost těchto nově připravených sloučenin vůči cholinesterasám (ChEs) byla v rámci *in vitro* testování stanovena Ellmanovou kolorimetrickou metodou a vyjádřena jako  $IC_{50}$ . Působení na mAChRs pak bylo určeno stanovením koncentrace intracelulárního vápníku za pomoci fluorescenčního indikátoru. Výsledky prokázaly schopnost nově syntetizovaných molekul inhibovat ChEs v mikromolárních a submikromolárních hodnotách  $IC_{50}$ , účinek na M1 mAChRs byl ovšem antagonistického charakteru.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis

Student: Markéta Kerhartová

Supervisor: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

Title of diploma thesis: Synthesis of novel hybrid molecules combining an M1 agonist and acetylcholinesterase inhibitors

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder of complex etiology, with insidious progression and fatal consequences. Its global incidence rates are very high, rising in line with the aging population. AD is manifested as a progressive decline of cognitive and intellectual functions. Histopathological hallmarks include the presence of  $\beta$ -amyloid neuritic plaques, neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated  $\tau$  protein and atrophy of brain tissue. Neurotransmitter levels are decreased in case of acetylcholine (ACh) while glutamate levels are elevated. Nowadays, there are two pharmacological groups employed in the treatment of AD: acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) and antagonist of *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) – memantine. Both groups act only symptomatically, not having disease-modifying effect. The aim of our study was preparation of a series of novel hybrid molecules combining AChEIs, namely tacrine, 7-methoxytacrine and 6-chlorotacrine, with molecule BQCA – positive allosteric modulator of M1 subtype of muscarinic ACh receptors (mAChRs). Inhibitory effectiveness of the newly synthesized compounds against cholinesterases (ChEs) was determined *in vitro* by the Ellman's colorimetric method and expressed as  $IC_{50}$ . The effect on mAChRs was determined by measurement of intracellular calcium concentration using fluorescent indicator. The results proved the ability of newly synthesized molecules to inhibit ChEs in the micromolar and sub-micromolar  $IC_{50}$  values, with antagonist activity towards M1 mAChRs.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>3</b>
2.1	Alzheimerova choroba .....	3
2.1.1	Klinická manifestace.....	3
2.1.2	Prevalence a incidence.....	3
2.1.3	Rizikové faktory a protektivní vlivy.....	4
2.1.4	Diagnostika .....	4
2.2	Patofyziologie .....	6
2.2.1	$\beta$ -amyloidní hypotéza .....	6
2.2.2	Tau hypotéza.....	9
2.2.3	Cholinergní hypotéza.....	10
2.2.4	Další hypotézy .....	12
2.3	Cholinesterasy .....	13
2.3.1	AChE .....	13
2.3.2	BChE.....	14
2.4	Léčba AD .....	15
2.4.1	Inhibitory acetylcholinesterasy (AChEIs) .....	15
2.4.2	Antagonisté NMDARs.....	17
2.4.3	MTDLs.....	17
2.5	Modulace M1 mAChRs a její potenciál v terapii AD.....	19
2.5.1	Spojení takrinu s xanomelinem.....	20
<b>3</b>	<b>Praktická část</b> .....	<b>21</b>
3.1	Syntetická část.....	21
3.1.1	Obecná syntetická část.....	21
3.1.2	Syntéza základních sloučenin a meziproductů .....	22
3.1.3	Syntéza BQCA.....	24

3.1.4	Syntéza finálních sloučenin .....	25
<b>4</b>	<b>Biologické testování .....</b>	<b>47</b>
4.1	Ellmanova metoda.....	47
4.2	Stanovení aktivity na M1 mAChRs.....	48
4.3	Výsledky testování .....	49
<b>5</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Seznam citované literatury .....</b>	<b>53</b>

# 1 Seznam zkratek

7-MEOTA – 7-methoxytakrin

AD – Alzheimerova choroba

ACh – acetylcholin

AChE – acetylcholinesterasa

AChEIs – inhibitory acetylcholinesterasy

ApoE – apolipoprotein E

APP – prekursor amyloidního proteinu

A $\beta$  – amyloid beta

BACE 1 – sekretasa štěpící APP,  $\beta$ -sekretasa

BChE – butyrylcholinesterasa, pseudocholinesterasa, plazmatická esterasa

BOP – (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)fosfonium-hexafluorofosfát

BQCA – 1-(4-methoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylová kyselina

CAS – katalytické aktivní místo

CNS – centrální nervový systém

DMF – *N,N*-dimethylformamid

DTNB – Ellmanovo činidlo, 5,5'-disulfandiylbis(2-nitrobenzoová kyselina)

*h*AChE – lidská rekombinantní acetylcholinesterasa

*h*BChE – lidská plazmatická butyrylcholinesterasa

HRMS – vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie

ChAT – cholinacetyltransferasa

ChEs – cholinesterasy

IC<sub>50</sub> – koncentrace sloučeniny, která sníží aktivitu enzymu na 50 % původní hodnoty

mAChRs – muskarinové acetylcholinové receptory



MAPT – s mikrotubuly asociovaný protein  $\tau$

MBD – doména vážící se na mikrotubuly

MTDLs – multi target directed ligands

nAChRs – nikotinové acetylcholinové receptory

NFTs – neurofibrilární klubka

NMDARs – *N*-methyl-D-aspartátové receptory

NPs – neuritické plaky

PAMs – pozitivní alosterické modulátory

PAS – periferní anionické místo

PHFs – párová helikální filamenta

PNS – periferní nervový systém

PS-1 – presenilin 1

PS-2 – presenilin 2

PSEN1 – gen pro presenilin 1

PSEN2 – gen pro presenilin 2

ROS – volné kyslíkové radikály

RT – laboratorní/pokojová teplota

SAR – vztah mezi strukturou a účinkem

SEM – standardní chyba průměru

SI – index selektivity

TEA – triethylamin

THA – takrin

TLC – tenkovrstvá chromatografie

## 2 Teoretická část

### 2.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je chronické progresivní neurodegenerativní onemocnění s komplexní etiologií. Jedná se o typ demence nejběžněji se vyskytující v současné populaci; projevuje se závažným kognitivním úpadkem. I přes velmi dobře popsané patofyziologické mechanismy podílející se na vzniku tohoto onemocnění, není v současné době stále k dispozici kauzální léčba. V konečném důsledku se tedy vždy jedná o onemocnění fatální.<sup>1,2</sup>

Onemocnění a jeho neuropatologické a klinické charakteristiky poprvé popsal roku 1906 německý psychiatr Alois Alzheimer, po němž je také tato choroba pojmenována.<sup>3</sup>

#### 2.1.1 Klinická manifestace

AD je onemocněním s pomalou, postupnou progresí. V rámci klinické praxe lze rozlišovat tři stadia této formy demence: lehké, střední a pokročilé stadium. Spolu s postupujícím onemocněním dochází k zhoršování kognitivních funkcí, které je natolik výrazné, že zásadním způsobem interferuje s běžným životem nemocných. Pacienti ztrácejí orientaci v prostoru a čase, mají potíže s vyjadřováním a péčí o sebe. Postupně se stávají zcela nesoběstačnými, a tak zůstávají odkázáni na péči svého okolí.<sup>4</sup> Onemocnění navíc provází i řada neuropsychiatrických příznaků jako jsou deprese, halucinace, deziluze či agrese vůči okolí.<sup>5</sup> Nemocní nejčastěji končí upoutání na lůžko a zcela závislí na péči druhých osob. Dlouhodobou imobilizaci provází zvýšená náchylnost k infekcím včetně pneumonie, která je v konečném důsledku jednou z nejčastějších příčin úmrtí pacientů s AD.<sup>6</sup>

#### 2.1.2 Prevalence a incidence

Napříč kontinenty je AD nejrozšířenějším typem demence u stárnoucích osob a představuje závažný sociálně-ekonomický problém pro světovou populaci. Incidence výrazně stoupá s věkem. Naprostá většina (> 95 %) postižených osob je diagnostikována ve věku 65 let a více, u minoritního počtu nemocných AD nastupuje již okolo 50. roku života.<sup>7</sup> Výskyt tohoto onemocnění se neustále zvyšuje, což souvisí především s globálním stárnutím populace. Údaje z roku 2010 uvádí, že celosvětově trpí demencí odhadem 35,6 milionů osob, přičemž se předpokládá, že toto číslo se bude každých 20 let zdvojnásobovat. V USA dle dat z roku 2015 trpí AD více než pět milionů obyvatel.<sup>8</sup>

V České republice byl na konci roku 2014 učiněn odhad na více než 150 tisíc osob s demencí.<sup>9</sup>

Prevalence AD u osob ve věku 65 let a více je asi 11 %, ve věkové skupině starších 85 let je postižena odhadem již třetina. Incidence AD je mezi všemi věkovými skupinami vyšší u žen než u mužů.<sup>10</sup> V rámci regionů je nejvyšší výskyt demence zaznamenán v Severní Americe a západní Evropě.<sup>7</sup>

### **2.1.3 Rizikové faktory a protektivní vlivy**

Vzhledem k výskytu nemoci u osob vyššího věku je za hlavní rizikový faktor považováno právě stárnutí. Významným a prokázaným rizikem je výskyt AD v rodinné anamnéze a dále vrozené genetické polymorfismy a mutace jako je Downův syndrom či přítomnost alely  $\epsilon 4$  apolipoproteinu E (ApoE).<sup>11</sup> Genetické rizikové faktory budou blíže popsány v kapitole 2.2.1.

Příčinou rozvoje AD mohou být dle provedených epidemiologických studií i úrazy hlavy. Zvýšené riziko vzniku onemocnění hrozí ženám v postmenopauzálním období v důsledku poklesu estrogenové aktivity a jako rizikové jsou popisovány i faktory přispívající ke vzniku kardiovaskulárních chorob – hypercholesterolémie, ateroskleróza, arteriální hypertenze, diabetes mellitus, kouření či obezita.<sup>12</sup> Svůj podíl na patogenezi AD mají zřejmě i environmentální aspekty jako například nízká úroveň vzdělání.<sup>11</sup>

Protektivním faktorem v rozvoji AD a v celkovém kontextu stárnutí jsou aktivity související se stimulací mozkové činnosti. Rovněž fyzická aktivita může snižovat rizika vzniku demence a má pozitivní vliv na zlepšení kognitivních funkcí u osob již postižených demencí. Obecně jsou jako protektivní vlivy AD hodnoceny všechny protizánětlivé aspekty. Příkladem může být dlouhodobé dodržování nízkokalorické diety, která je spojena s vyšší mozkovou neurogenezí a sníženou produkcí volných kyslíkových radikálů.<sup>8</sup>

### **2.1.4 Diagnostika**

Diagnóza se provádí na základě podrobného zhodnocení lékařských záznamů a rodinné anamnézy pacienta, rovněž se zjišťují kognitivní a behaviorální změny pomocí série testů a dotazníků. Do diagnostiky AD patří také neurologické vyšetření. V rámci diferenciální diagnózy a ke zjištění strukturálních změn mozkové tkáně se provádí magnetická rezonance nebo počítačová tomografie. Z krve či cerebrospinalní tekutiny lze

stanovit specifické biomarkery, které lze identifikovat již před nástupem klinických příznaků.<sup>10,13</sup>

U pacientů diagnostikovaných ve věku 65 let a více mluvíme o takzvaném „pozdním nástupu AD“. U pacientů, u nichž se nemoc začala projevovat dříve, hovoříme o „časném nástupu AD“.<sup>10</sup>

## 2.2 Patofyziologie

Patologické změny provázející AD lze rozdělit do dvou samostatných skupin:

- a) poškození neurotransmiterních systémů
- b) strukturální změny mozkové tkáně.

Změny funkce neurotransmiterů zahrnují deficit acetylcholinu (ACh) a s tím související snížení aktivity enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT, E.C. 2.3.1.6), který je za syntézu ACh zodpovědný. Ve skupině cholinergních receptorů dochází k snížení počtu nikotinových receptorů (nAChRs), přičemž počet muskarinových receptorů (mAChRs) nevykazuje signifikantní změny. Narušení funkcí cholinergního systému je prokazatelně spojeno s poruchami paměti a poklesem kognitivních funkcí. Trvale alterován je také adrenergní a serotoninergní systém, což má souvislost s neuropsychiatrickými projevy nemoci.<sup>14</sup> Dále dochází k zvýšení hlavního excitačního neurotransmiteru – glutamátu, a tím i k nadměrné glutaminergní stimulaci, která může vést k neuronálnímu poškození až excitotoxicitě.<sup>15</sup>

Změny struktury mozkové tkáně jsou spojeny s úbytkem neuronů a narušením buněčných funkcí. Tyto změny se projevují celkovou atrofií mozku. Ztráta neuronů je lokalizována ve velkých neuronech mozkové kůry a v dalších vybraných oblastech mozku, jimiž jsou především amygdala, entorhinální kůra, Meynertovo jádro, locus coeruleus a hipokampus. Vedle úbytku neuronálních buněk a synapsí je hlavním diagnostickým znakem AD přítomnost intracelulárních neurofibrilárních klubek (NFTs), tvořených hyperfosforylovaným proteinem tau, a dále výskyt extracelulárních amyloidních depozit, nazývaných senilní či neuritické plaky (NPs). V iniciální fázi dochází k formování NFTs v oblasti transentorhinální kůry a následně se změny šíří do dalších oblastí, NPs se objevují až v terminálním stadiu nemoci.<sup>14,15</sup> Tyto patologické změny se mohou začít rozvíjet až 20 let před vznikem klinických příznaků nemoci.<sup>10</sup>

Problematiku patofyziologie AD podrobněji popisují následující hypotézy.

### 2.2.1 $\beta$ -amyloidní hypotéza

Tato hypotéza se zakládá na tvrzení, že příčinou rozvoje AD je nadměrná akumulace peptidu amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ), která následně vede ke vzniku NPs v mozkové tkáni nemocných.  $A\beta$  je peptid skládající se z 39–43 aminokyselin a vzniká štěpením prekurzoru amyloidního proteinu (APP) kódovaného na chromosomu 21 (Obr. 1).

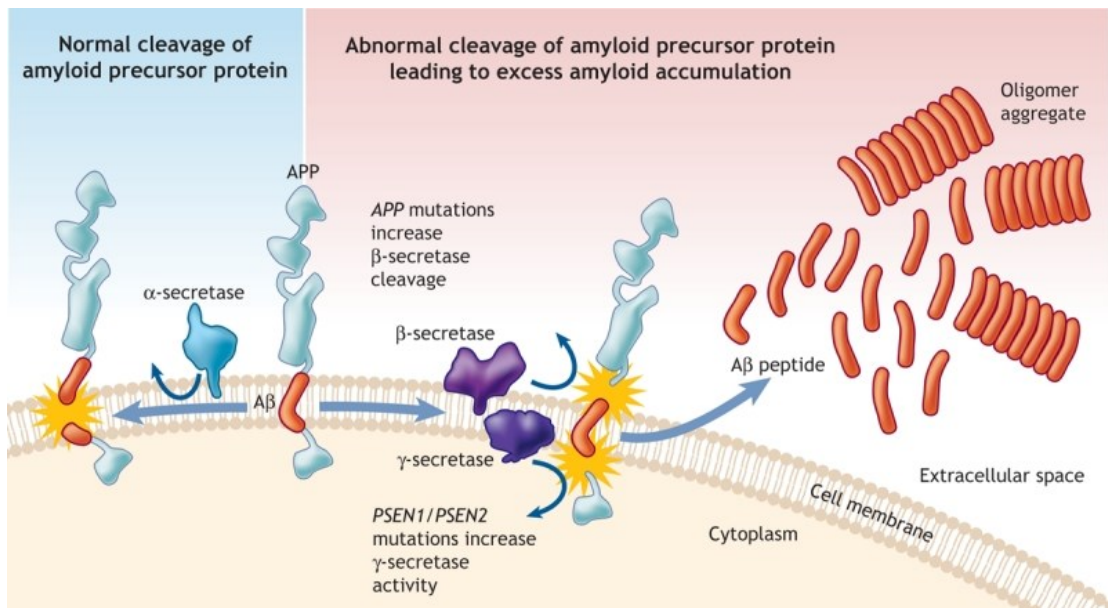
Isoforma A $\beta$ <sub>40</sub> je nejběžněji se vyskytující formou, hlavní složkou NPs je pak isoforma A $\beta$ <sub>42</sub>, která je hydrofobní a je charakterizována rychlou agregací.<sup>16</sup>

APP je komplex transmembránového glykoproteinu, který je zpracováván dvěma odlišnými cestami: amyloidogenní (štěpením APP pomocí  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasy) a neamyloidogenní (štěpením  $\alpha$ - a  $\gamma$ -sekretasou). Prostřednictvím enzymatického štěpení APP  $\alpha$ - a  $\gamma$ -sekretasou vznikají rozpustné sAPP $\alpha$  fragmenty, které vykazují neuroprotektivní charakter. Štěpením APP  $\beta$ -sekretasou dochází ke vzniku sAPP $\beta$  a membránově vázaného proteinového terminálního fragmentu C99, ten je dále štěpen  $\gamma$ -sekretasou a dává vzniknout monomerům A $\beta$  o různé délce.<sup>16,17</sup>  $\beta$ -Sekretasa je rovněž označována jako  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1 (BACE-1); jedná se o transmembránovou aspartátovou proteasu a jakožto enzym podílející se prokazatelně na vzniku A $\beta$  se zdá být perspektivním cílem léčiv pro terapii AD.<sup>18</sup>  $\gamma$ -Sekretasa je makromolekulární komplex a katalytická podjednotka skládající se ze čtyř proteinů, jedním z nich je i presenilin (PS).<sup>19</sup> Presenilin má dvě formy, a to PS-1 a PS-2. Geny pro presenilin, analogicky nazývány PSEN1 a PSEN2, se vyskytují na chromosomu 14 a 1. Mutace v těchto genech zapříčiňuje změněnou funkci  $\gamma$ -sekretasy, alteraci zpracování APP a vede k signifikantnímu nárůstu A $\beta$ <sub>42</sub>.<sup>16</sup>

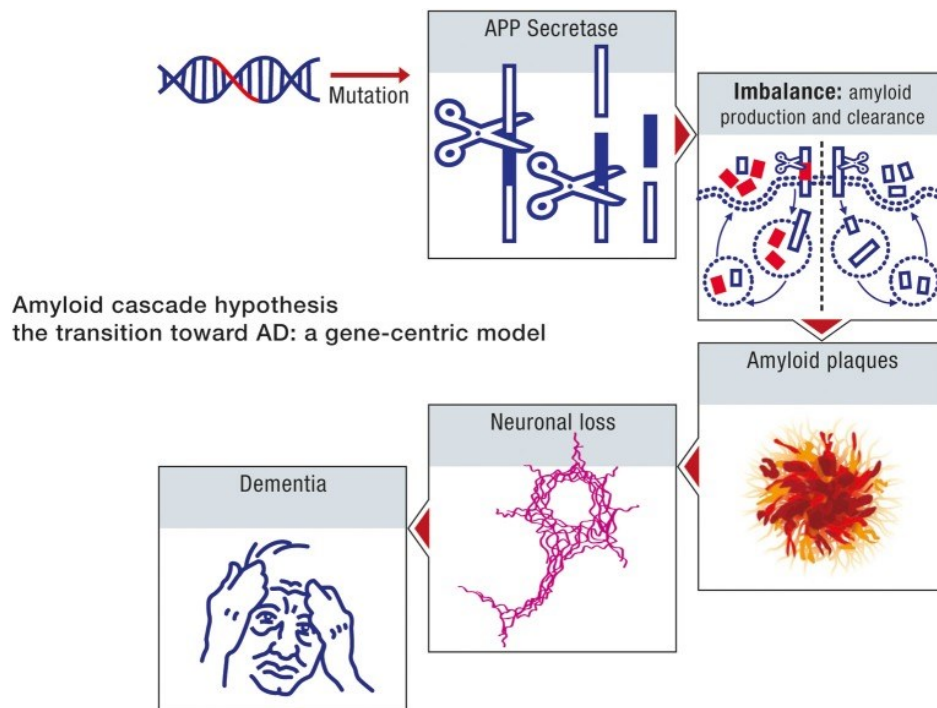
Souhrnně lze říci, že mutace v PSEN1, PSEN2 či v genu pro APP vedou ke zvýšené produkci a hromadění A $\beta$ <sub>42</sub>, který vytváří NPs a oligomery. Tyto oligomery narušují nervové synapse a poškozují neurony, což vede k neuronální dysfunkci, buněčné smrti a úbytku neurotransmiterů. Důsledkem je rozvoj demence (Obr. 2).<sup>20</sup>

Dalším faktorem uplatňujícím se v patogenezi AD v souvislosti s  $\beta$ -amyloidní hypotézou je polymorfismus ApoE. Jedná se o protein složený z 299 aminokyselin, který se účastní metabolismu lipidů a jejich transportu. ApoE se vyskytuje ve třech alelách:  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 a  $\epsilon$ 4. Alela  $\epsilon$ 4 ApoE je významným genetickým rizikovým faktorem pro pozdní nástup AD, ovlivňuje ukládání A $\beta$  a je prokazatelně součástí NPs. V provedených studiích bylo dokázáno, že u nosičů alely  $\epsilon$ 4 je depozice A $\beta$  v mozkové tkáni výraznější a jeho odbourávání celkově sníženo.<sup>21</sup>

Na toxicitě A $\beta$  se podílí celá řada dalších patologických mechanismů, které zahrnují: oxidativní stres spojený s produkcí volných kyslíkových radikálů (ROS), intracelulární akumulaci Ca<sup>2+</sup>, produkci oxidu dusnatého a prozánětlivých molekul, cerebrální hypoperfúzi či aktivaci apoptotických mechanismů.<sup>17</sup>



**Obrázek 1.** Zpracování APP a vznik Aβ. APP je štěpen α-sekretasou a γ-sekretasou za vzniku neamyloidních peptidů či β-sekretasou (BACE-1) a γ-sekretasou za vzniku neurotoxických agregujících monomerů. Mutace v genu pro APP upřednostňují zpracování APP β-sekretasou, mutace v PSEN1/PSEN2 podporují štěpení γ-sekretasou. Obrázek převzat z citace <sup>22</sup>.



**Obrázek 2.** Hypotéza amyloidní kaskády. Genové mutace způsobují nerovnováhu mezi produkcí a odbouráváním Aβ, což vede k jeho ukládání ve formě neuritických (amyloidních) plaků a zániku neuronů. Obrázek převzat z citace <sup>23</sup>.

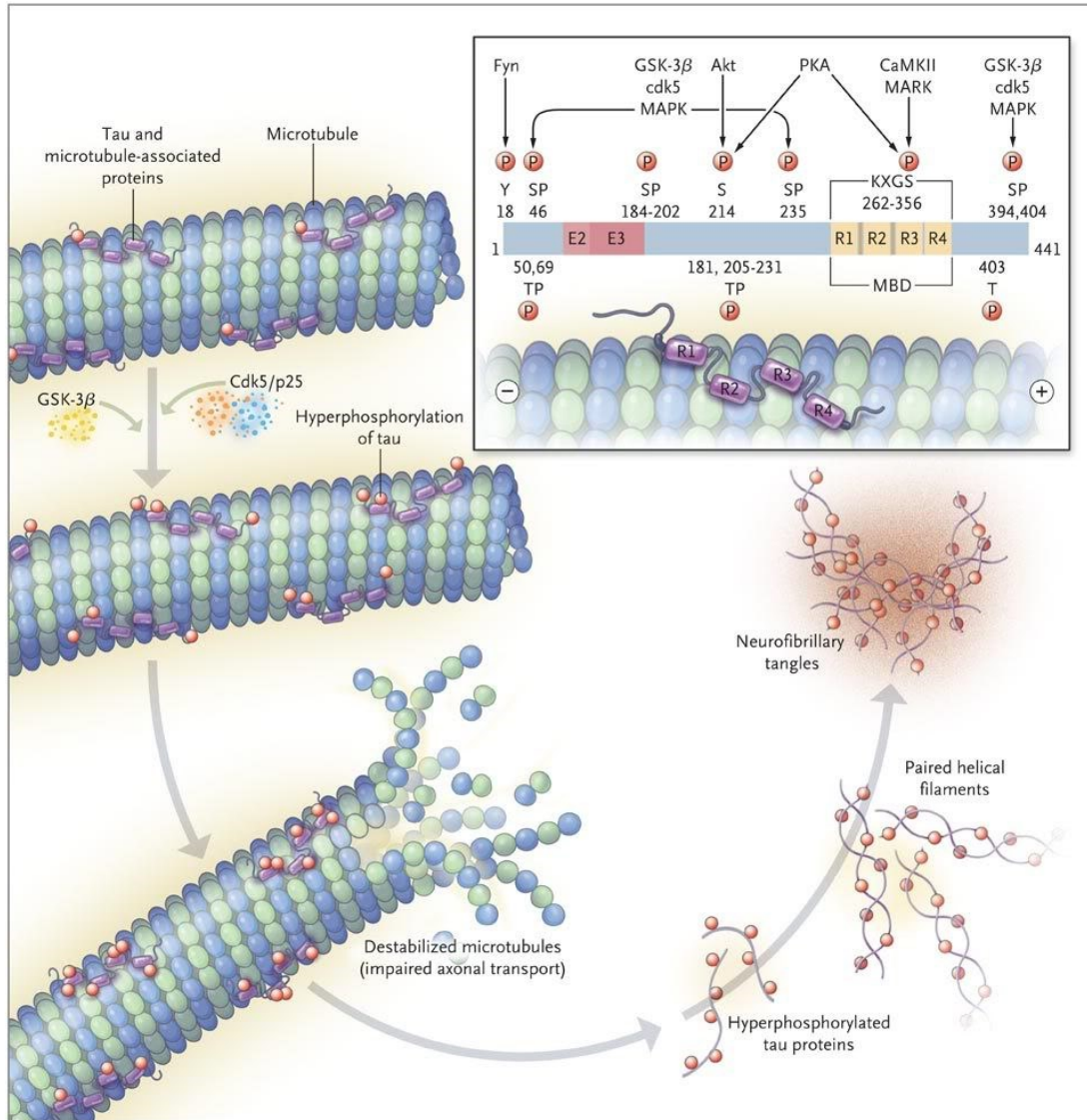
### 2.2.2 Tau hypotéza

Tau ( $\tau$ ) je protein asociovaný s mikrotubuly a jak vyplývá z tohoto označení, jeho fyziologickou funkcí je stabilizace mikrotubulů jakožto základních komponent cytoskeletu. Funkce proteinu  $\tau$  může být ovšem patologicky změněna (především hyperfosforylací), následkem čehož dochází k jeho agregaci vedoucí k neurotoxicitě.<sup>24</sup>

Původním předpokladem bylo, že  $\tau$  protein je pouze sekundárním jevem v patologii A $\beta$ . Pozdější *in vivo* výzkumy ukázaly, že má zásadní význam v procesu vzniku neurotoxicity zprostředkované A $\beta$ .<sup>25,26</sup> Mutace  $\tau$  proteinu má kauzativní úlohu nejen v rozvoji AD, ale i dalších neurodegenerativních chorob. Tyto patologické jevy jsou souhrnně označovány jako tauopatie.<sup>25</sup>

Jak bylo uvedeno výše, funkcí  $\tau$  proteinu je sestavovat tubulinové podjednotky do struktury mikrotubulů a zajišťovat jejich celkovou stabilizaci. Tato schopnost je regulována stupněm jeho fosforylace.  $\tau$  protein je kódován genem pro protein  $\tau$  asociovaný s mikrotubuly (MAPT), gen se nachází na chromosomu 17 a v mozku je exprimován v celkem šesti isoformách.<sup>27</sup> Jeho strukturální součástí je doména vážící se na mikrotubuly (MBD); ta se skládá ze čtyř opakujících se sekvencí aminokyselin, které jsou fosforylovány kinasami. Mutací  $\tau$  proteinu dochází k hyperfosforylaci, a tím ke snížení afinity k mikrotubulům. Takto patologicky změněný  $\tau$  protein navíc polymerizuje do párových helikálních filament (PHFs), které se shlukují do podoby NFTs (Obr. 3).<sup>16</sup>





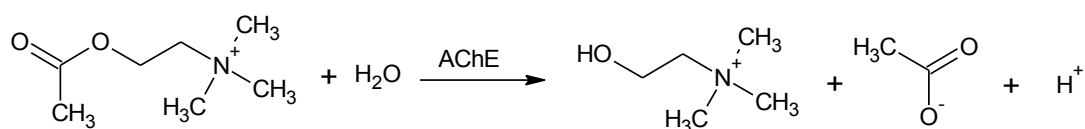
**Obrázek 3.** Hyperfosforylace proteinu  $\tau$  způsobuje destabilizaci mikrotubulů a formaci PHFs, vedoucí ke vzniku NFTs. Obrázek převzat z citace <sup>16</sup>.

### 2.2.3 Cholinergní hypotéza

Cholinergní hypotéza byla první uvedenou hypotézou pokoušející se vysvětlit patofyziologii AD. Zakládá se na faktu, že u osob trpících AD dochází ke zjiřitelnému poklesu cholinergní aktivity v centrálním nervovém systému (CNS). Role ACh v procesu učení a paměti byla potvrzena ve studiích provedených na primátech a jeho pokles je prokazatelně spojen s kognitivní dysfunkcí.<sup>28,29</sup> Teorie byla představena v polovině 70. let 20. století, kdy byl v posmrtných studiích u osob s AD zjiřtěn úbytek ChAT, enzymu syntetizujícího ACh. S cholinergní teorií pracují i současné terapeutické přístupy.<sup>30</sup>

ACh je neurotransmitter CNS i periferního nervového systému (PNS), je využíván všemi pre- i postgangliovými neurony parasymptiku a veškerými pregangliovými a částí postgangliových neuronů sympatiku. Cholinergní neurony využívající ACh jsou v CNS široce rozšířeny a inervují téměř všechny oblasti mozku. Cholinergní systém je zásadní pro řadu procesů jako jsou učení, paměť, pozornost, smyslové vnímání, cyklus bdění a spánku či odpověď na stres.

ACh je syntetizován enzymem ChAT v cytoplazmě cholinergních neuronů z cholinu a acetyl-koenzymu-A. Dále je transportován do vezikul, kde je také skladován. ACh se váže na cholinergní receptory a jejich modulací dále působí stimulačně či inhibičně. Při depolarizaci cholinergních neuronů dochází k jeho exocytóze z vezikul a uvolnění do synaptické štěrbině, kde je rychle odbouráván katalytickým enzymem acetylcholinesterasou (AChE, E.C. 3.1.1.7) (Schéma 1). Rozlišujeme dva základní typy acetylcholinových receptorů: muskarinové (mAChRs) a nikotinové (nAChRs).<sup>31</sup>



*Schéma 1. Hydrolyza ACh na cholin a acetát.*

### 2.2.3.1 nAChRs

nAChRs jsou spojeny s iontovými kanály selektivními pro  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ . Rozlišujeme devět typů těchto receptorů, které jsou umístěny v CNS, bazálních gangliích a svalech. V PNS dochází skrze jejich aktivaci k rychlému synaptickému přenosu; oproti tomu v oblasti CNS mají spíše modulační úlohu. nAChRs v CNS jsou vysoce propustné pro  $\text{Ca}^{2+}$  a při jejich stimulaci se koncentrace tohoto kationu v presynaptické membráně zvýší, dochází k uvolňování dalších neurotransmiterů – ACh, noradrenalinu, dopaminu, glutamátu, gama-aminomáselné kyseliny či serotoninu.<sup>31</sup>

### 2.2.3.2 mAChRs

Tento typ cholinergních receptorů je spřažen s G-proteinem. Dosud bylo popsáno pět subtypů mAChRs – M1 až M5. Nejlépe popsána je funkce subtypů M1, M2 a M3. M1 receptory jsou umístěny v nervových buňkách a buňkách exokrinních žláz, M2 v buňkách srdečních a M3 receptory jsou lokalizovány v buňkách hladké svaloviny. Stimulace mAChRs může působit excitačně nebo inhibičně. M1, M3 a M5 subtypy jsou spojeny s  $\text{G}_q$  proteinem, jejich stimulace vede k aktivaci druhých posílů (fosfolipasy C

či inositol-fosfátu) a zvýšení buněčné dráždivosti. M2 a M4 subtypy jsou spojené s proteinem  $G_i$  (inhibují produkci cyklického adenosinmonofosfátu), při stimulaci těchto receptorů dochází k inhibici  $Ca^{2+}$  kanálů, čímž se snižuje buněčná dráždivost.<sup>31,32</sup>

#### **2.2.4 Další hypotézy**

Vedle těchto tří nejčastěji prezentovaných hypotéz jsou popisovány i další. Pracuje se například s hypotézou založenou na mitochondriálním poškození jakožto průvodním jevu v patogenezi AD. Další alternativu představuje metabolická hypotéza, která tvrdí, že spouštěčem choroby jsou ovlivnitelné metabolické rizikové faktory jako obezita či diabetes. Další z řady, vaskulární hypotéza, prezentuje, že k rozvoji AD dochází v souvislosti se sníženým prokrvením mozkové tkáně.<sup>33</sup> Často diskutovaným problémem je dyshomeostáza kovových iontů (zejména mědi, železa a zinku), neboť  $A\beta$  je proteinem vážícím kovy. Dyshomeostáza těchto iontů navíc podněcuje tvorbu ROS, vedoucích k oxidativnímu stresu, který je rovněž jednou ze zásadních hypotéz vniku AD.<sup>34</sup>

O AD se v poslední době hovoří jako o diabetu typu III, v kontextu tohoto označení je AD považována za neuroendokrinní chorobu se značnou podobností diabetu mellitu typu II. V mozku pacientů trpících AD dochází k zřetelnému snížení exprese inzulínu a neuronálních inzulínových receptorů. Tento fakt vede k inzulínové rezistenci a negativnímu ovlivnění metabolismu mozku, které má za následek kognitivní dysfunkci.<sup>35</sup>

Nejnověji bylo zveřejněno tvrzení prezentující kauzativní roli mikrobů v etiologii AD. Dle této teorie může během stárnutí dojít k reaktivaci latentních forem infekčních agens a spuštění patologických mechanismů vedoucích až k AD.<sup>36</sup>

## 2.3 Cholinesterasy

Cholinesterasy (ChEs) jsou skupinou enzymů katalyzující primárně rozklad ACh za vzniku octové kyseliny a cholinu. Jsou známy dva typy těchto enzymů, které se liší substrátovou specifitou; jedná se o acetylcholinesterasu (AChE, E.C. 3.1.1.7) a butyrylcholinesterasu (BChE, E.C. 3.1.1.8).<sup>37</sup> Obě tyto esterasy jsou přítomny ve velkém množství v lidském těle, mají podobnou strukturu a jsou řazeny do proteinové nadrodiny  $\alpha/\beta$  hydrolas. AChE je cílem léčiv pro terapii AD, myastenii gravis i místem působení organofosforových sloučenin (nervově paralytické látky, insekticidy).<sup>38</sup>

### 2.3.1 AChE

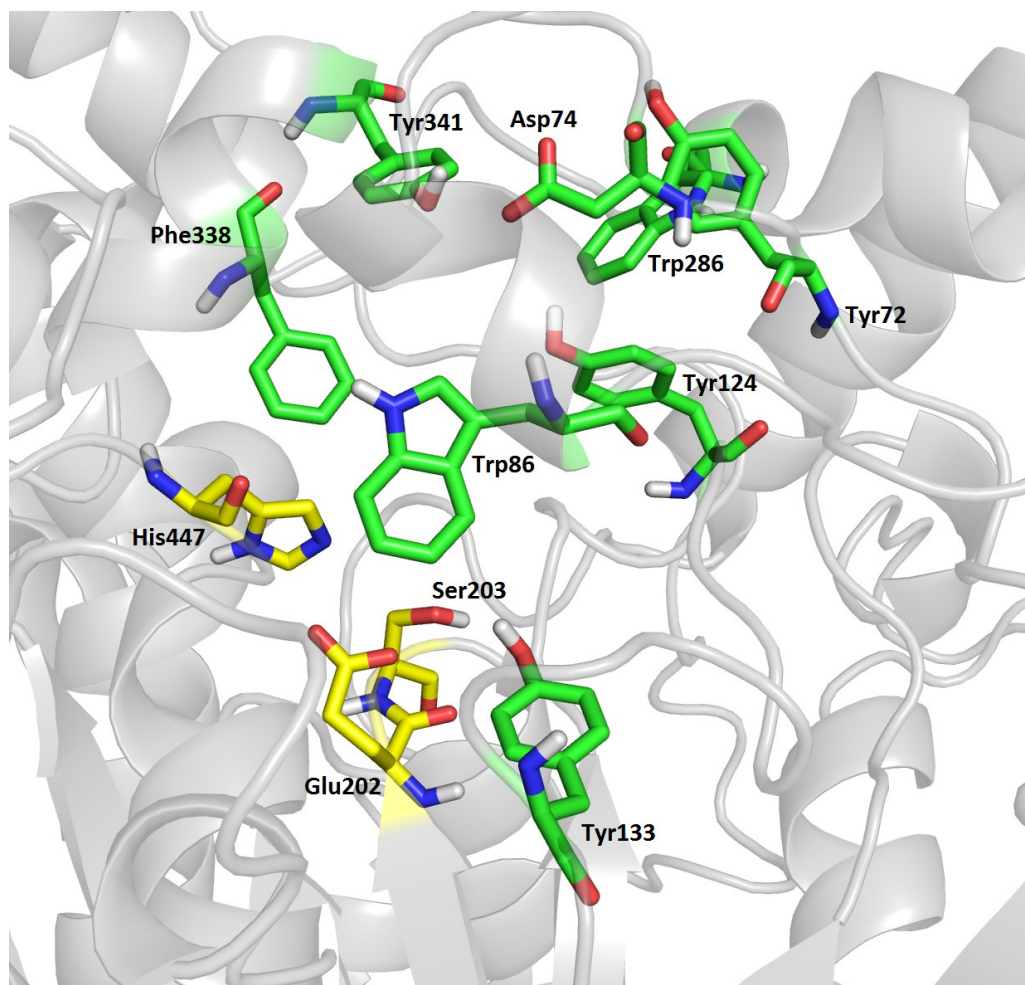
AChE patří do skupiny serin-proteinových hydrolas přítomných v cholinergních nervových synapsích a nervosvalové ploténce. Specifickým substrátem pro AChE je ACh, který je činností tohoto enzymu velmi rychle hydrolyzován na acetát a cholin. Touto hydrolyzou je terminována fyziologická funkce ACh jakožto neuromediátoru přenášejícího nervové vzruchy v cholinergním systému.<sup>39</sup> AChE je lokalizována v mnoha buňkách i na povrchu erytrocytů, nejvyšší aktivitu vykazuje v cholinergním nervovém systému.<sup>38</sup>

Strukturně se jedná o  $\alpha/\beta$  protein elipsoidního tvaru obsahující dvanáct  $\beta$ -skládaných listů, které obklopuje čtrnáct  $\alpha$ -šroubovic. Dominantou enzymu je přítomnost úzké a 20 Å hluboké kavity prezentující aktivní místo. Tato hluboká dutina enzymu je lemovaná čtrnácti aromatickými rezidui zprostředkujícími kation- $\pi$  interakce s amoniovou skupinou ACh.<sup>39</sup> Struktura AChE zahrnuje primárně dvě vazebná místa: katalytické aktivní místo (CAS) a periferní anionické místo (PAS).<sup>40</sup>

Aktivní místo je odpovědné za hydrolyzu ACh. Skládá se z katalytické triády aminokyselin Ser203-His447-Glu202 (číslování dle lidské AChE). Obsahuje rovněž tzv. kation- $\pi$  místo tvořené Trp86, Tyr133 a Phe338, které interaguje s kvarterní amoniovou skupinou ACh a hlídá tak jeho správnou orientaci v CAS (Obr. 4).<sup>38,41</sup>

ACh prostupuje do aktivního místa přes PAS a rezidua tvořená aromatickými zbytky.<sup>38</sup> PAS se také označuje jako  $\beta$ -anionické místo a jeho úlohou je zachycovat substrát při cestě do aktivního místa. Vazbou různých typů ligandů na toto místo dochází k změně konformace aktivního místa.<sup>41</sup> Nachází se na povrchu molekuly AChE, podílí se na necholinergních funkcích ACh a zřejmě hraje úlohu při ukládání A $\beta$ . Obsahuje rezidua

pěti aminokyselin Tyr 72, Asp 74, Tyr 124, Trp 286 a Tyr 341, které jsou určující pro jeho vlastnosti.<sup>38</sup> S PAS jsou schopny interagovat nekompetitivní inhibitory AChE.<sup>39</sup>



**Obrázek 4.** Struktura enzymu AChE. Katalytická triáda je vyobrazena žlutými uhlíkovými atomy, aminokyselinová rezidua hrající klíčovou roli pro vazbu ACh nebo jiných ligandů zelenými uhlíkovými atomy. Obrázek byl vytvořen v PyMOL 1.3. (PDB ID: 4EY7).

### 2.3.2 BChE

Označuje se také jako pseudocholinesterasa či plazmatická cholinesterasa; vzniká v játrech a je dále transportována plazmou.<sup>38</sup> Přítomna je především v periferních tkáních, pouze minoritně v mozku. BChE pomáhá regulovat neurotransmisi ACh, na rozdíl od AChE ale nemá přirozený substrát. Ačkoliv fyziologická důležitost BChE nebyla přesně stanovena, účastní se odbourávání mnoha exogenních látek (např. kokainu, prokainu, succinylcholinu či acetylsalicylové kyseliny).<sup>42</sup> Její aktivita je signifikantně zvýšena při rozvoji AD a hraje důležitou úlohu při agregaci A $\beta$  a vzniku NPs. Zdá se, že

v rámci terapie je vyšší selektivita vůči AChE spojena s nižším výskytem nežádoucích účinků.<sup>43</sup>

## 2.4 Léčba AD

V současné době je k dispozici pouze symptomatická léčba AD, která navazuje na cholinergní hypotézu. Dostupné jsou dvě farmakologické skupiny (Obr. 5): inhibitory acetylcholinesterasy (AChEIs) a antagonisty *N*-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDARs), memantin. Léčiva zaměřená na léčbu příčin rozvoje AD jsou nyní předmětem farmaceutických výzkumů a klinických studií. Soustředí se zejména na  $\beta$ -amyloidní teorii a cílí na inhibici sekrecy při zpracování APP a zabránění akumulaci  $A\beta$ . Snahou je rovněž terapeuticky ovlivnit hyperfosforylaci  $\tau$  proteinu inhibicí příslušných kinas.<sup>33</sup>

### 2.4.1 Inhibitory acetylcholinesterasy (AChEIs)

Jedná se o látky inhibující enzym AChE, čímž nepřímo působí zvýšení hladin ACh. V klinické praxi našly využití donepezil, rivastigmin, galantamin a takrin. Poslední jmenovaný, takrin, není v současnosti schváleným léčivem. Jedná se o velmi dobře tolerovaná léčiva, jejichž vedlejší účinky jsou do značné míry dávkově závislé; nicméně v terapii AD má tato skupina pouze omezenou účinnost.<sup>33,43</sup>

AChEIs jsou využívány pro léčbu lehkých a středně těžkých forem AD.<sup>44</sup> Pozitivní efekt na ovlivnění kognitivních funkcí v rámci terapie AChEIs trvá pouze omezenou dobu, v průměru jeden až tři roky, a nedokáže ovlivnit progresi onemocnění. Mezi jednotlivými léčivy není výraznější rozdíl v účinnosti, avšak terapie donepezilem vykazuje nižší výskyt nežádoucích účinků.<sup>31</sup>

#### 2.4.1.1 Donepezil

Donepezil (chemicky (*RS*)-2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on) byl uveden na trh roku 1996 pod obchodním názvem Aricept®. Jedná se o reverzibilní, nekompetitivní AChEI se selektivním účinkem na AChE. V rámci terapie AD se jedná o velmi dobře tolerované a bezpečné léčivo. Částečně zabraňuje agregaci  $A\beta$  do fibril a působí protektivně vůči glutamátové toxicitě.<sup>44</sup> Donepezil vykazuje smíšený typ inhibice, což znamená, že je současně schopen interagovat jak s CAS, tak i PAS enzymu AChE.<sup>43</sup> V terapii AD se podává v dávce 5–10 mg jednou denně.<sup>44</sup>

#### 2.4.1.2 Rivastigmin

Rivastigmin ([3-[(1*S*)-(dimethylamino)ethyl]fenyl]-*N*-ethyl-*N*-methyl-karbamát) je pseudoireverzibilním centrálně účinným kompetitivním inhibitorem karbamátového typu, inhibuje jak AChE, tak i BChE. Na trh byl uveden pod obchodním názvem Exelon<sup>®</sup>.<sup>44</sup> Karbamátová část molekuly se kovalentně váže na aktivní místo ChEs a působí jejich inhibici.<sup>43</sup> Pro terapii je rivastigmin dostupný ve formě tablet a transdermálních náplastí. Obvyklá denní dávka se pohybuje v rozmezí 6–12 mg.<sup>44</sup>

#### 2.4.1.3 Galantamin

Galantamin ((4*aS*,6*R*,8*aS*)-(3-methoxy-11-methyl-5,6,9,10,11,12-hexahydro-4*aH*-[1]-benzofuro-[3*a*,3,2-*ef*][2]benzazepin-6-ol), Reminyl<sup>®</sup>) je alkaloid původně izolovaný z druhů rostlinné čeledi *Amaryllidaceae*, kterými jsou například *Galanthus woronowi* či *Galanthus nivalis*. Jeho selektivita je výrazně vyšší vůči AChE než BChE. AChE inhibuje kompetitivně a reverzibilně, přičemž se váže na dno kavity aktivního místa enzymu. Nutno říci, že schopnost galantaminu inhibovat AChE je výrazně nižší než u dříve zmiňovaných látek – rivastigminu a donepezilu. Vykazuje ovšem unikátní duální účinek, neboť jako jediný z AChEIs působí pozitivní alosterickou modulaci nAChRs a tím zesiluje cholinergní transmissi. Nevýhodou je nutnost jeho podávání ve dvou denních dávkách a častý výskyt gastrointestinálních potíží.<sup>43,44</sup>

#### 2.4.1.4 Takrin

Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin, THA) je nekompetitivním reverzibilním inhibitorem AChE i BChE, který se roku 1993 pod obchodním názvem Cognex<sup>®</sup> stal prvním schváleným lékem v terapii AD. Takrin vykazuje zlepšení cholinergních funkcí, působí rovněž na monoaminové systémy a iontové kanály, má také schopnost snižovat agregaci A $\beta$ . Limitující pro jeho použití v praxi byla ovšem špatná biologická dostupnost po perorálním podání, nutnost podávání čtyřikrát denně a výskyt častých nežádoucích účinků. Nejzávažnějším vedlejším účinkem byla často fatální hepatotoxicita, kvůli které byl stažen z trhu.<sup>45</sup> Předmětem mnoha výzkumů je modifikace struktury takrinu, která by vedla k redukci nežádoucích účinků a zvýšení inhibiční aktivity vůči AChE.<sup>43</sup>

##### 2.4.1.4.1 7-MEOTA

7-Methoxytakrin (9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin, 7-MEOTA) je méně toxickým derivátem THA, který byl připraven v České republice. Původně byl

vyvíjen jako antidotum proti nervově paralytickým látkám. Stejně jako takrin interaguje jak s CAS, tak i PAS. Nižší toxicita derivátu 7-MEOTA je zřejmě dána odlišnou metabolickou dráhou, kdy metabolit představuje 7-hydroxytakrin, který je konjugován s kyselinou glukuronovou a vylučován močí. *In vivo* projevuje 7-MEOTA inhibiční aktivitu vůči AChE srovnatelnou s takrinem.<sup>45,46</sup>

#### **2.4.2 Antagonisté NMDARs**

Při AD dochází k zvýšení hladiny glutamátu, který působí nadměrnou stimulací NMDARs a má za následek hromadění vápníku v neuronech a poškození mitochondrií. Antagonisté NMDARs působí proti této nadměrné stimulaci, terapeuticky je z této skupiny používán memantin.<sup>33</sup>

##### *2.4.2.1 Memantin*

Memantin (3,5-dimethyladamantan-1-amin, Ebixa<sup>®</sup>) je indikován k léčbě středně těžkých a těžkých stadií AD. Jedná se o nekompetitivního antagonistu NMDARs, který působí symptomatické zlepšení projevů AD. Jeho účinnost je podporována i skrze nekompetitivní antagonistické působení na serotoninové 5-HT<sub>3</sub> receptory a nAChRs. Maximální denní dávka je 20 mg.<sup>44</sup>

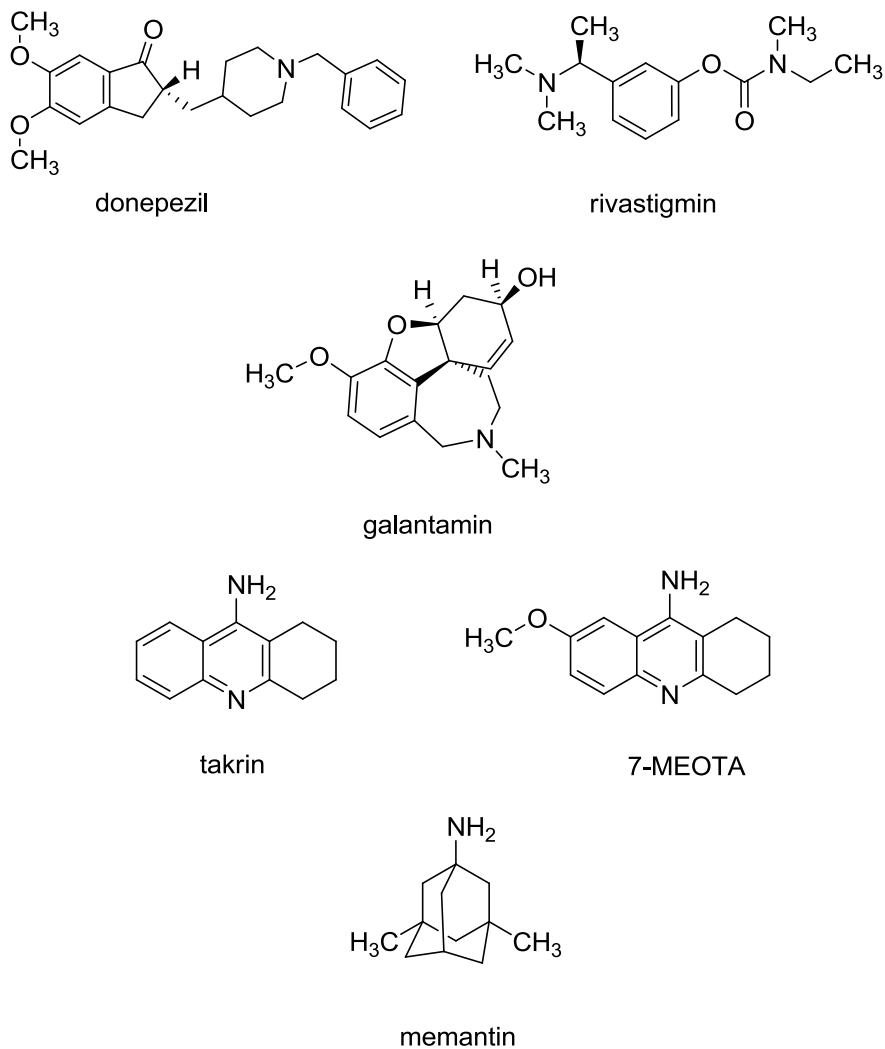
Memantin je u středně těžké a těžké formy AD možné podávat v kombinaci s AChEIs; existují důkazy o propojení cholinergních a glutaminergních drah, a tak o racionalitě této dvojkombinace. Benefity této terapie potvrzují i klinické studie.<sup>47</sup>

#### **2.4.3 MTDLs**

Multi target directed ligands (MTDLs) je pojem označující sloučeniny, které jsou schopny současně modulovat více aspektů daného onemocnění. Jejich komplexnost v mnoha případech zabraňuje i progresi onemocnění. Výzkum nových sloučenin pro terapii AD je na tuto strategii často orientován. Nejčastěji modifikovanými strukturami jsou terapeuticky využívané molekuly ze skupiny AChEIs.<sup>46</sup> MTDLs je v současnosti preferovanou strategií ve výzkumu léčiv pro terapii dalších neurodegenerativních onemocnění. K racionalitě této strategie přispívá fakt, že se jedná o multifaktoriální choroby s množstvím patologických změn. Kombinace farmakoforů s odlišným farmakologickým efektem může vést nejen ke komplexnímu účinku nově vzniklých hybridů, ale i potencovat účinek výchozích sloučenin.<sup>48</sup> Jako výhody MTDLs je možné uvést použití jediné molekuly, které vede k usnadnění optimalizace farmakokinetického a farmakodynamického profilu, snížení farmakologických interakcí s jinými léčivy



a dále fakt, že výzkum hybridních molekul je méně finančně náročný než hledání nových struktur.<sup>49</sup>



**Obrázek 5.** Chemické struktury sloučenin využívaných k terapii AD na úrovni klinické praxe nebo základního výzkumu působící jako AChEIs a nebo jako antagonisté NMDARs.

## 2.5 Modulace M1 mAChRs a její potenciál v terapii AD

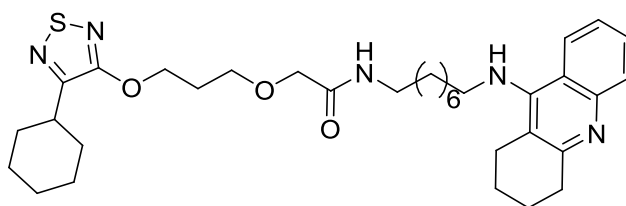
M1 receptory jsou nejčastěji se vyskytujícím subtypem mAChRs v CNS. Jsou exprimovány ve všech hlavních oblastech přední části mozku – hippocampu, kortexu, hypothalamu a striatu. Jejich stimulace ovlivňuje množství fyziologických funkcí, mezi něž patří i funkce kognitivní a paměťové. Bylo rovněž dokázáno, že aktivace M1 receptorů snižuje tvorbu A $\beta$  podpořením neamyloidogenní cesty štěpení APP pomocí  $\alpha$ -sekretasy, navíc je schopna snižovat  $\tau$  hyperfosforylaci ovlivněním klíčových kinas a představuje tak nadějný cíl v léčbě AD. Léčebná strategie zaměřená na aktivaci M1 subtypu mAChRs by dle provedených studií dokázala zlepšovat kognitivní funkce a zároveň zpomalovat progresi onemocnění.<sup>50</sup>

V důsledku stimulace M1 mAChRs dochází *in vivo* k zlepšení symptomů AD, aktivace M4 receptorů má pozitivní vliv na zlepšení neuropsychiatrických symptomů, ale současná stimulace dalších subtypů (zejména M2 a M3) je spojena s výskytem nežádoucích účinků jako jsou nauzea a zvracení. Z tohoto důvodu je cílem dosáhnout co nejvyšší selektivity k subtypu M1.<sup>51</sup>

První generaci molekul ovlivňujících M1 mAChRs tvoří selektivní agonisté orthosterických míst. Orthosterická vazebná místa všech pěti subtypů mAChRs jsou velmi podobná, a tak je dosažení úplné selektivity k subtypu M1 v rámci této skupiny velmi obtížné.<sup>50</sup> Do klinických studií postoupila například molekula xanomelinu, která je schopna aktivovat M1 a M4 subtyp mAChRs a *in vivo* vykázala zlepšení kognitivních a neuropsychiatrických symptomů AD.<sup>31</sup> Xanomelin ovšem selhal v druhé fázi klinického testování, jeho klinické použití limitují nežádoucí účinky, které zahrnují silnou nauzeu a průjem. I ostatní látky z této skupiny vykazovaly podobné nežádoucí účinky. Ve snaze dosáhnout vyšší selektivity k M1 mAChRs byla vyvinuta skupina alosterických modulátorů M1 subtypu, která zahrnuje alosterické agonisty a pozitivní alosterické modulátory (PAMs). PAMs neaktivují M1 receptory přímo, ale vazbou na alosterická místa mění konformaci receptoru a zvyšují afinitu ACh k receptoru. Ke své aktivaci tedy nezbytně potřebují přítomnost ACh.<sup>31,50</sup> Do skupiny PAMs patří mimo jiné 1-(4-methoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylová kyselina (BQCA), která má schopnost redukovat množství ACh, potřebné k aktivaci M1 receptoru. *In vivo* ukázala zlepšení kognitivních funkcí a navíc zřejmě podporuje neamyloidogenní zpracování APP.<sup>50,51</sup>

### 2.5.1 Spojení takrinu s xanomelinem

Fang a kolektiv připravili hybridní molekulu spojující takrin s orthosterickým agonistou M1 mAChRs, xanomelinem. K propojení obou struktur použili spojovací řetězce čítající 10–17 atomů. Nejperspektivnější molekula (Obr. 6) z připravené série vykazovala inhibiční schopnost vůči AChE ( $pIC_{50} = 8,21$  nM) i BChE ( $pIC_{50} = 8,23$  nM). Hodnoty byly určeny pro AChE z elektrického úhoře, pro BChE z koňského séra a vyjádřeny jako  $pIC_{50} = -\log IC_{50}$ . Afinita nových molekul k M1 mAChRs byla podobná nebo vyšší v porovnání s xanomelinem a mnohonásobně vyšší ve srovnání s THA.<sup>52</sup>



**Obrázek 6.** Hybridní molekula takrinu s xanomelinem, Fang a kol. Převzato z citace<sup>52</sup>.

## 3 Praktická část

### 3.1 Syntetická část

Syntéza cílových sloučenin spojujících takrinové deriváty s BQCA probíhala v několika krocích. Syntéza intermediátů je dále popsána schematicky, tyto reakce byly již dříve uvedeny v literatuře.<sup>53,54</sup> Rovněž syntéza BQCA vycházela z již uveřejněných postupů.<sup>55</sup> Podrobně bude popsána syntéza finálních produktů.

#### 3.1.1 Obecná syntetická část

Chemikálie použité k syntetickým reakcím byly dodány firmou Sigma-Aldrich v kvalitě p.a. (Česká republika), rozpouštědla byla dodána firmou Penta Chemicals, s.r.o.

Průběh reakcí byl monitorován za pomoci tenkovrstvé chromatografie (TLC) na hliníkových deskách potažených silikagelem 60 F254 (Merck, Česká republika). Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu s velikostí částic 0,063–0,200 mm a s porozitou 60 (Merck, Česká republika).

Všechny deriváty byly charakterizovány hmotnostní spektrometrií a NMR spektry a teplotou tání.

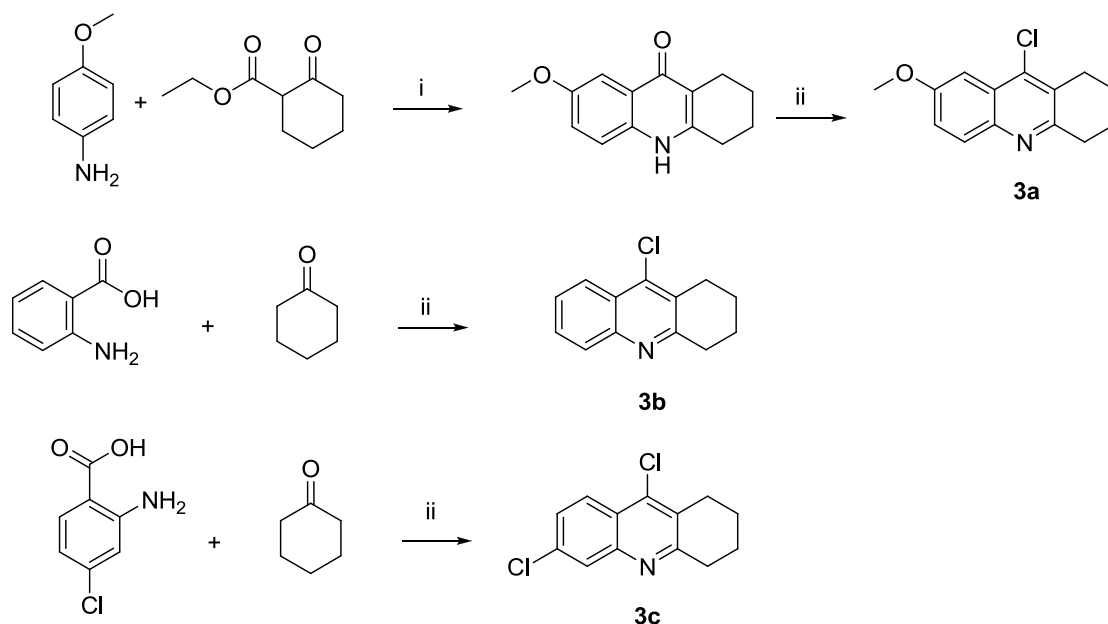
<sup>1</sup>H NMR a <sup>13</sup>C NMR spektra byla změřena na spektrometru Varian S500 (při frekvenci 500 MHz pro <sup>1</sup>H NMR spektra a 126 MHz pro <sup>13</sup>C NMR spektra; Varian Comp. Palo Alto, USA) nebo na spektrometru Varian Mercury VX BB 300 (při frekvenci 300 MHz pro <sup>1</sup>H NMR spektra a 75 MHz pro <sup>13</sup>C NMR spektra; Varian Comp. Palo Alto, USA). Chemické posuny  $\delta$  jsou uváděny v ppm a vztaženy k referenčnímu standardu tetramethylsilanu.

Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS) byla měřena na spektrometru Q Exactive Plus hybrid quadrupole-orbitrap.

Teploty tání byly měřeny na bodotávku BÜCHI Switzerland – Melting Point M-565.

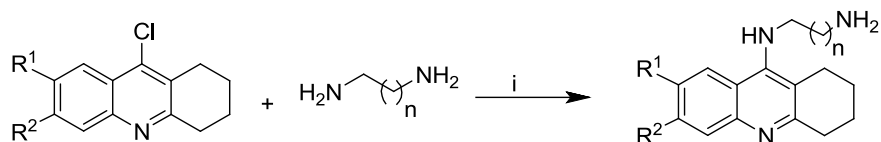
### 3.1.2 Syntéza základních sloučenin a meziproduktů

V prvním kroku byly připraveny deriváty THA s přítomností chloru v poloze 9 (Schéma 2); 9-chlor-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin (**3a**), 9-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin (**3b**) a 6,9-dichloro-1,2,3,4-tetrahydroakridin (**3c**). Výtěžky a spektrální údaje odpovídaly údajům uvedeným v literatuře.<sup>53,54</sup>



**Schéma 2.** Reakční podmínky: i) toluen, *p*-toluensulfonová kyselina, Dean-Starkova aparatura, difenylether; ii)  $POCl_3$ , reflux.

Sloučeniny **3a**, **3b**, **3c** byly podrobeny nukleofilní substituci příslušným 1, $\omega$ -alkandiaminem s délkou řetězce 2–8 uhlíků (Schéma 3). Výtěžky reakcí se pohybovaly v rozmezí 70–90 % a odpovídaly dříve publikovaným výsledkům.<sup>53,54</sup> Ve výsledku vzniklo 21 sloučenin – meziproduktů, jejichž identita byla potvrzena HRMS a NMR.



**3a:** R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>; R<sup>2</sup> = H

**3b:** R<sup>1</sup> = H; R<sup>2</sup> = H

**3c:** R<sup>1</sup> = H; R<sup>2</sup> = Cl

n = 1 - 7

**4a:** R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H; n = 1

**4b:** R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H; n = 2

**4c:** R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H; n = 3

**4d:** R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H; n = 4

**4e:** R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H; n = 5

**4f:** R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H; n = 6

**4g:** R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = H; n = 7

**4h:** R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H; n = 1

**4i:** R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H; n = 2

**4j:** R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H; n = 3

**4k:** R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H; n = 4

**4l:** R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H; n = 5

**4m:** R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H; n = 6

**4n:** R<sup>1</sup> = OCH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H; n = 7

**4o:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; n = 1

**4p:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; n = 2

**4q:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; n = 3

**4r:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; n = 4

**4s:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; n = 5

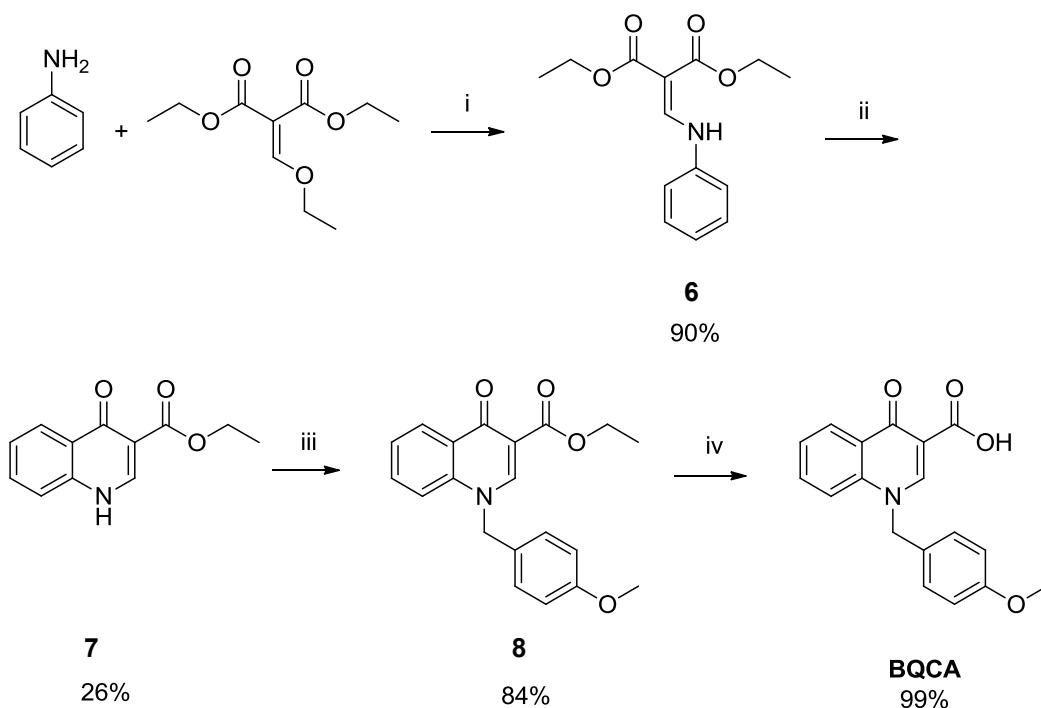
**4t:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; n = 6

**4u:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl; n = 7

**Schéma 3.** Reakční podmínky: i) fenol, z laboratorní teploty (RT) plynule na 130 °C, 2–4 h.

### 3.1.3 Syntéza BQCA

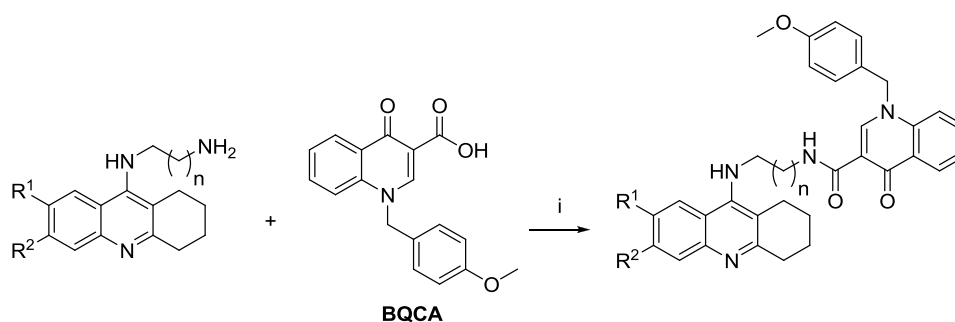
Reakční podmínky syntézy BQCA vycházely z již dříve popsaného postupu a byly pouze mírně obměněny.<sup>55</sup> Samotná syntéza probíhala ve čtyřech krocích (Schéma 4). První krok zahrnoval tzv. Gould-Jacobsovu kondenzaci, jednalo se o reakci anilinu (1 eq) s diethyl-ethoxymethylenmalonátem (1 eq), čímž byl získán 1,3-diethyl-2-[(fenylamino)methyliden]propandioát (**6**). Cykloacylací produktu **6** v difenyletheru byl získán ethyl-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylát (**7**), ten byl v dalším kroku benzylován pomocí 1-(brommethyl)-4-methoxybenzen (1 eq) za vzniku ethyl-esteru BQCA neboli ethyl-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylátu (**8**). V posledním kroku byl intermediát **8** podroben bazické hydrolyze esterů pomocí LiOH (2 eq) za vzniku 1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylové kyseliny (BQCA). Reakční směs byla na závěr acidifikována na pH 1, zfiltrována, promyta ethyl-acetátem a vysušena. Výsledný produkt měl vzhled bílého prášku. Celkový výtěžek reakce byl 19 %, výtěžnosti jednotlivých meziproductů jsou uvedeny ve Schématu 4. Výtěžky, teplota tání a spektrální údaje odpovídaly refenci.



**Schéma 4.** Čtyřstupňová syntéza BQCA. Reakční podmínky: i) z RT na 165 °C, 6 h; poté 1 M HCl, za RT na 115 °C, 3 h; ii) difenylether, 228–232°C, 3 h; iii) 1-(brommethyl)-4-methoxybenzen, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bezvodý, 95 °C, KI v DMF, 24h; iv) LiOH, H<sub>2</sub>O/MeCN, RT, přes noc.

### 3.1.4 Syntéza finálních sloučenin

Jednotlivé sloučeniny *N*-( $\omega$ -aminoalkyl)takrinových derivátů (**4a–4u**, 1 eq) a BQCA (1 eq) byly rozpuštěny v 20 ml suchého *N,N*-dimethylformamidu (DMF) pod atmosférou argonu, poté byl přidán triethylamin (TEA, 3 eq). Tato reakční směs byla míchána za RT po dobu jedné hodiny, po uplynutí této doby byl přidán katalyzátor (benzotriazol-1-ylloxy)tris(dimethylamino)fosfonium-hexafluorofosfát (BOP, 1 eq). Reakční směs byla míchána dalších 48 hodin a následně rozpuštěna v 200 ml dichlormethanu. Organická vrstva byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl (2 × 100 ml) a destilované vody (1 × 100 ml), poté vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a rozpouštědlo odstraněno vakuovou destilací. Čištění produktu bylo provedeno sloupcovou chromatografií s mobilní fází CHCl<sub>3</sub>/MeOH 40:1 a průběžně monitorováno pomocí TLC s mobilní CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1. Po odpaření rozpouštědla byly získány finální produkty jako pevné látky. Identita a čistota takto připravených produktů (**5a–5u**) (Schéma 5) byla potvrzena HRMS (v kombinaci s HPLC, nekalibrovaná čistota) a NMR. Podrobné charakteristiky konečných produktů jsou uvedeny na následujících stranách.



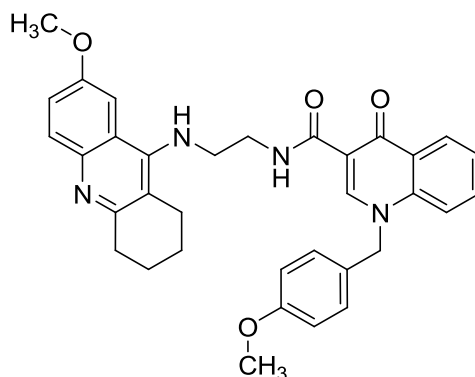
<b>4a:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 1	<b>4l:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 5	<b>5a:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 1	<b>5l:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 5
<b>4b:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 2	<b>4m:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 6	<b>5b:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 2	<b>5m:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 6
<b>4c:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 3	<b>4n:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 7	<b>5c:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 3	<b>5n:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 7
<b>4d:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 4	<b>4o:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 1	<b>5d:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 4	<b>5o:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 1
<b>4e:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 5	<b>4p:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 2	<b>5e:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 5	<b>5p:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 2
<b>4f:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 6	<b>4q:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 3	<b>5f:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 6	<b>5q:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 3
<b>4g:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 7	<b>4r:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 4	<b>5g:</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> = H; n = 7	<b>5r:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 4
<b>4h:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 1	<b>4s:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 5	<b>5h:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 1	<b>5s:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 5
<b>4i:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 2	<b>4t:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 6	<b>5i:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 2	<b>5t:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 6
<b>4j:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 3	<b>4u:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 7	<b>5j:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 3	<b>5u:</b> R <sup>1</sup> = H, R <sup>2</sup> = Cl; n = 7
<b>4k:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 4		<b>5k:</b> R <sup>1</sup> = OCH <sub>3</sub> , R <sup>2</sup> = H; n = 4	

**Schéma 5.** Syntéza finálních sloučenin (**5a–5u**). Reakční podmínky *i*) DMF, TEA; RT, 1h, následně BOP, 48h.



Chemický název: *N*-{2-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]ethyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5a**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 41 % (174 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 128,4–130,1 °C

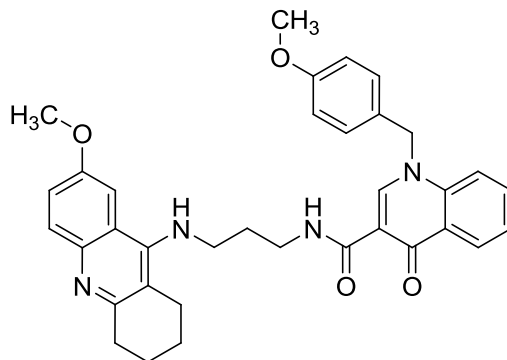
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>) δ 10,57 (t, *J* = 6,3 Hz, 1H), 9,01 (s, 1H), 8,43 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,88–7,81 (m, 1H), 7,80–7,68 (m, 2H), 7,61–7,47 (m, 2H), 7,41 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 7,29 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,94 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 5,70 (s, 2H), 4,20 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H), 4,00 (s, 3H), 3,92 (t, *J* = 5,4 Hz, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,07 – 2,96 (m, 2H), 2,96–2,88 (m, 2H), 1,99–1,83 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>) δ 176,92, 167,99, 160,60, 157,81, 155,65, 152,02, 149,26, 140,44, 136,23, 133,76, 129,17, 128,70, 127,97, 127,36, 125,97, 124,26, 123,70, 119,32, 118,60, 115,22, 113,82, 111,57, 103,91, 57,14, 56,35, 55,56, 51,39, 40,48, 30,29, 25,68, 23,08, 21,90.

HRMS: 563,2637 (vypočítáno pro: [C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 563,2614)

Chemický název: *N*-{3-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]propyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5b**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 78 % (253 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 162,7–164,7 °C

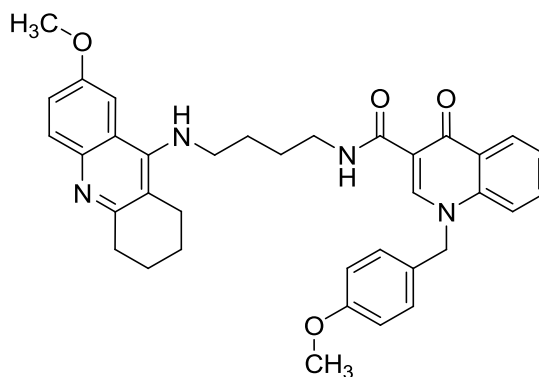
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,46 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,49 (dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 1H), 8,23 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 7,78 (t, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,66 (ddd, *J* = 8,7, 7,0, 1,6 Hz, 1H), 7,63 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 7,54 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,47 (ddd, *J* = 7,9, 7,0, 0,9 Hz, 1H), 7,29 (dd, *J* = 9,2, 2,4 Hz, 1H), 7,25 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,19–7,15 (m, 1H), 7,15–7,11 (m, 2H), 6,90–6,85 (m, 2H), 5,48 (s, 2H), 3,94–3,91 (m, 5H), 3,77 (s, 3H), 3,68 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,19 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,80 (t, *J* = 5,9 Hz, 2H), 2,04–1,97 (m, 2H), 1,92–1,82 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176,76, 166,95, 159,72, 157,09, 155,27, 149,84, 148,03, 139,29, 133,14, 128,95, 128,14, 127,79, 127,02, 125,79, 125,21, 123,70, 121,94, 117,51, 117,04, 114,64, 111,28, 110,87, 102,82, 57,28, 55,81, 55,27, 43,32, 36,80, 35,38, 28,37, 24,75, 22,19, 21,39, 20,66.

HRMS: 577,2779 (vypočítáno pro: [C<sub>35</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 577,2770)

Chemický název: *N*-{4-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]butyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5c**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 91 % (396 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 220,5–221,8 °C

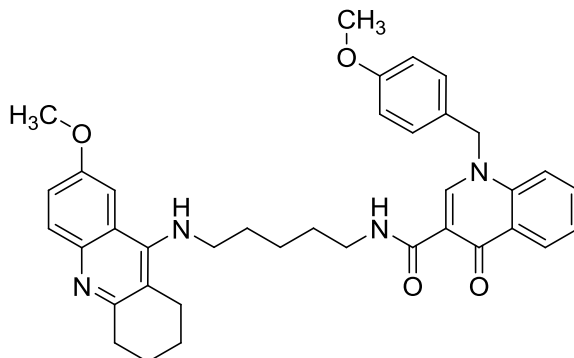
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,26 (t, *J* = 5,9 Hz, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,40 (dd, *J* = 8,1, 1,5 Hz, 1H), 7,70 (dd, *J* = 9,3, 0,9 Hz, 1H), 7,67–7,60 (m, 1H), 7,53–7,39 (m, 4H), 7,07 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 6,85–6,79 (m, 1H), 6,04 (bs, 1H), 5,39 (s, 2H), 4,03–3,94 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,59–3,49 (m, 2H), 2,98–2,90 (m, 2H), 2,65–2,58 (m, 2H), 2,03–1,75 (m, 8H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176,64, 165,37, 159,64, 156,92, 155,46, 149,28, 147,92, 139,19, 133,07, 132,96, 127,77, 127,72, 126,79, 125,91, 125,28, 124,21, 121,09, 117,06, 116,93, 114,55, 111,43, 111,31, 103,61, 57,10, 55,81, 55,25, 47,67, 47,34, 38,47, 28,21, 28,14, 26,73, 23,67, 21,78, 20,49.

HRMS: 591,2942 (vypočítáno pro: [C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 591,2927)

Chemický název: *N*-{5-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]pentyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5d**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 58 % (365 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 66,7–68,0 °C

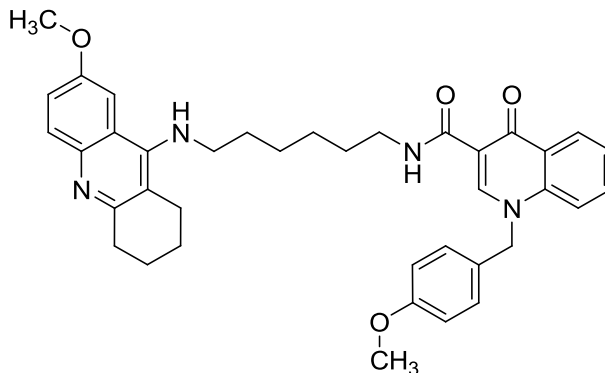
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,08 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,47 (dd,  $J = 8,1, 1,6$  Hz, 1H), 7,90 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H), 7,60 (ddd,  $J = 8,6, 6,9, 1,6$  Hz, 1H), 7,47–7,38 (m, 2H), 7,28 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H), 7,21 (dd,  $J = 9,1, 2,7$  Hz, 1H), 7,12–7,02 (m, 2H), 6,86–6,78 (m, 2H), 5,35 (s, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 3,58–3,42 (m, 4H), 3,09–2,98 (m, 2H), 2,76–2,64 (m, 2H), 1,92–1,49 (m, 10H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,73, 164,96, 159,63, 156,06, 154,43, 151,10, 148,06, 139,18, 132,78, 127,98, 127,95, 127,65, 127,61, 127,03, 125,86, 125,06, 121,14, 120,17, 116,78, 115,67, 114,57, 111,85, 102,01, 57,15, 55,52, 55,23, 48,70, 38,75, 32,27, 31,16, 29,32, 24,51, 24,34, 22,71, 22,18.

HRMS: 605,3079 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_4]^+$  605,3083)

Chemický název: *N*-{6-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]hexyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5e**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 37 % (133 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 76,7–78,7 °C

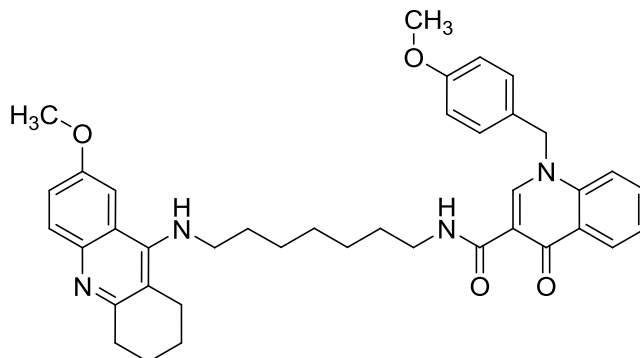
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,03 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 8,79 (s, 1H), 8,37 (dd, *J* = 8,1, 1,5 Hz, 1H), 7,78 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,60–7,50 (m, 1H), 7,45–7,28 (m, 2H), 7,24–7,14 (m, 1H), 7,05–6,97 (m, 2H), 6,80–6,70 (m, 2H), 5,31 (s, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,66 (s, 3H), 3,40 (q, *J* = 6,5 Hz, 2H), 3,02–2,90 (m, 2H), 2,65–2,51 (m, 2H), 1,90–1,52 (m, 8H), 1,49–1,36 (m, 4H), 1,23–1,14 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176,79, 165,08, 159,94, 159,67, 156,75, 156,64, 148,84, 148,06, 139,25, 134,09, 132,93, 127,94, 127,75, 126,99, 125,94, 125,17, 123,08, 117,48, 116,93, 114,81, 114,60, 111,79, 103,02, 57,16, 55,78, 55,28, 47,97, 38,70, 31,00, 29,68, 29,36, 26,32, 26,03, 24,06, 22,20, 21,22.

HRMS: 619,3203 (vypočítáno pro: [C<sub>38</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 619,3240)

Chemický název: *N*-{7-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]heptyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5f**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 53 % (320 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 90,8–92,8 °C

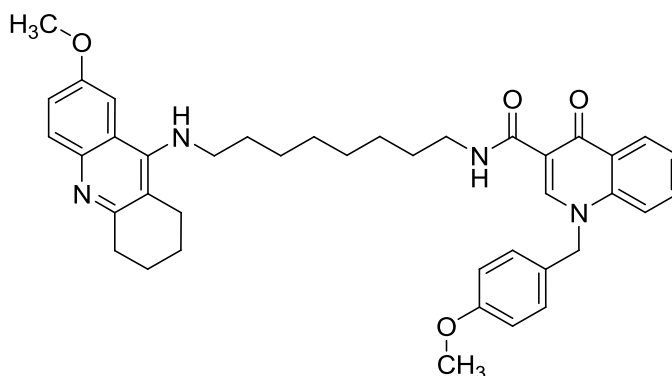
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,06 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H), 8,89 (s, 1H), 8,48 (dd,  $J = 8,1, 1,6$  Hz, 1H), 7,86 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 7,60 (ddd,  $J = 8,6, 7,0, 1,6$  Hz, 1H), 7,48–7,38 (m, 2H), 7,29 (d,  $J = 2,7$  Hz, 1H), 7,23 (dd,  $J = 9,2, 2,7$  Hz, 1H), 7,08 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H), 6,85–6,81 (m, 2H), 5,37 (s, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 3,54 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 3,46 (td,  $J = 6,9, 5,6$  Hz, 2H), 3,06–2,99 (m, 2H), 2,72–2,66 (m, 2H), 1,88 (p,  $J = 4,5$  Hz, 4H), 1,76–1,60 (m, 4H), 1,49–1,37 (m, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,74, 164,84, 159,63, 156,09, 154,05, 151,44, 148,07, 148,06, 139,19, 132,73, 127,96, 127,62, 127,44, 127,02, 125,91, 125,00, 121,38, 119,95, 116,76, 115,35, 114,56, 111,94, 102,16, 57,12, 55,52, 55,23, 48,78, 39,05, 32,01, 31,42, 29,38, 28,90, 26,85, 26,70, 24,35, 22,63, 22,10.

HRMS: 633,3363 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_4]^+$  633,3396)

Chemický název: *N*-{8-[(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]oktyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5g**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 26 % (326 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 76,7–78,0 °C

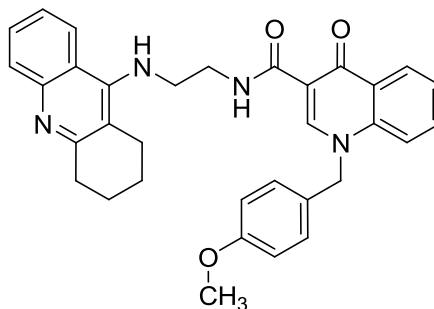
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,07 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H), 8,87 (s, 1H), 8,44 (dd,  $J = 8,1, 1,6$  Hz, 1H), 7,81 (d,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 7,65–7,55 (m, 1H), 7,46 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 7,43–7,36 (m, 2H), 7,32–7,26 (m, 1H), 7,13–7,02 (m, 2H), 6,87–6,76 (m, 2H), 5,37 (s, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,83–3,74 (m, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,42 (q,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 3,05–2,95 (m, 2H), 1,97–1,81 (m, 4H), 1,76 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 1,60 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 1,49–1,18 (m, 10H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,74, 164,91, 159,59, 156,62, 154,14, 150,73, 148,05, 139,20, 135,57, 132,84, 127,89, 127,67, 126,91, 125,92, 125,07, 123,30, 123,19, 117,95, 116,88, 114,53, 112,62, 111,80, 103,19, 57,11, 55,69, 55,22, 48,33, 39,10, 36,79, 36,73, 31,00, 29,43, 28,89, 26,75, 26,48, 23,79, 22,05, 21,08.

HRMS: 647,3577 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_4]^+$  647,3553)

Chemický název: 1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-*N*-{2-[(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]ethyl}-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5h**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 63 % (640 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 125,0–126,3 °C

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,46 (t,  $J = 5,9$  Hz, 1H), 8,93 (s, 1H), 8,55–8,51 (m, 1H), 8,09 (dt,  $J = 8,5, 1,1$  Hz, 1H), 7,95 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,65 (ddd,  $J = 8,6, 7,0, 1,7$  Hz, 1H), 7,55 (ddd,  $J = 8,3, 6,8, 1,3$  Hz, 1H), 7,51–7,45 (m, 2H), 7,34 (ddd,  $J = 8,3, 6,8, 1,3$  Hz, 1H), 7,15–7,08 (m, 2H), 6,91–6,85 (m, 2H), 5,43 (s, 2H), 3,87–3,80 (m, 4H), 3,79 (s, 3H), 3,07 (t,  $J = 5,8$  Hz, 2H), 2,80 (t,  $J = 5,8$  Hz, 2H), 1,94–1,85 (m, 4H).

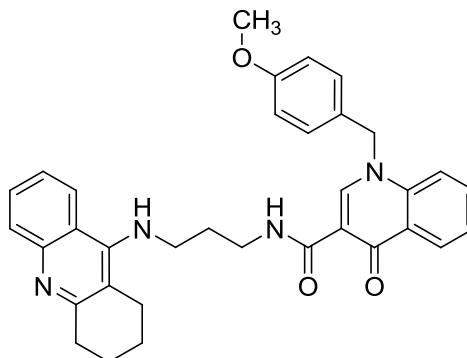
$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,74, 166,59, 159,81, 151,39, 148,19, 139,30, 132,97, 128,67, 128,42, 128,04, 127,66, 127,44, 127,29, 125,81, 125,32, 124,78, 123,79, 122,96, 119,67, 116,81, 115,51, 114,72, 114,03, 111,44, 57,30, 55,31, 50,42, 40,27, 25,03, 23,01, 22,53.

HRMS: 533,2549 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{33}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_3]^+$  533,2508)



Chemický název: 1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-*N*-{3-[(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]propyl}-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5i**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 23 % (245 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 148,0–150,7 °C

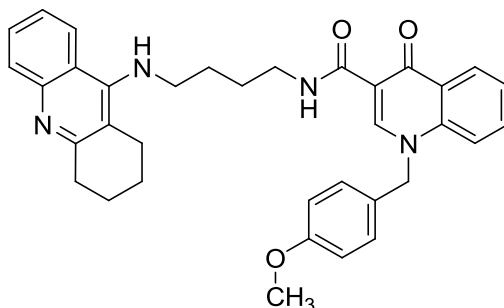
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,31 (t,  $J = 6,3$  Hz, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,51 (dd,  $J = 8,1, 1,6$  Hz, 1H), 8,16–8,10 (m, 2H), 7,63 (ddd,  $J = 8,7, 7,0, 1,6$  Hz, 1H), 7,56 (ddd,  $J = 8,3, 6,8, 1,3$  Hz, 1H), 7,51–7,43 (m, 2H), 7,37 (ddd,  $J = 8,3, 6,8, 1,3$  Hz, 1H), 7,14–7,08 (m, 2H), 6,89–6,84 (m, 2H), 5,44 (s, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,72 (t,  $J = 6,2$  Hz, 2H), 3,66 (q,  $J = 6,2$  Hz, 2H), 3,17–3,12 (m, 2H), 2,81–2,75 (m, 2H), 2,00–1,93 (m, 2H), 1,88 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,77, 166,18, 159,72, 155,54, 152,75, 148,14, 139,24, 132,95, 129,71, 127,95, 127,64, 127,12, 125,77, 125,44, 125,27, 124,21, 123,01, 118,45, 116,86, 114,65, 114,14, 111,34, 57,29, 55,26, 44,77, 35,88, 31,57, 29,61, 24,71, 22,67, 21,89.

HRMS: 547,2670 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_3]^+$  547,2664)

Chemický název: 1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-*N*-{4-[(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]butyl}-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5j**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 19 % (200 mg)

Vzhled: hnědý prášek

Teplota tání: nestanoveno, amorfní pevná látka

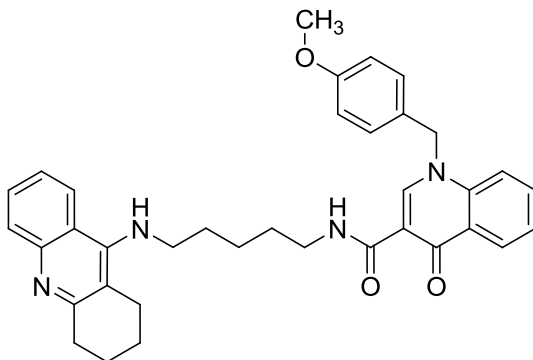
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,16 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,51 (dd,  $J = 8,2$ , 1,6 Hz, 1H), 8,00 (dd,  $J = 8,6$ , 1,3 Hz, 1H), 7,93 (dd,  $J = 8,4$ , 1,2 Hz, 1H), 7,63 (ddd,  $J = 8,6$ , 7,0, 1,7 Hz, 1H), 7,53 (ddd,  $J = 8,3$ , 6,8, 1,3 Hz, 1H), 7,50–7,42 (m, 2H), 7,34 (ddd,  $J = 8,3$ , 6,8, 1,3 Hz, 1H), 7,13–7,08 (m, 2H), 6,88–6,83 (m, 2H), 5,40 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,61 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 3,57–3,51 (m, 2H), 3,10–3,03 (m, 2H), 2,74–2,67 (m, 2H), 1,88–1,76 (m, 4H), 1,28–1,22 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,78, 165,04, 159,71, 157,37, 151,31, 148,09, 146,12, 139,25, 132,81, 128,79, 128,01, 127,65, 127,46, 127,13, 125,88, 125,11, 123,84, 123,00, 119,58, 116,79, 115,32, 114,64, 111,86, 57,22, 55,26, 48,96, 38,73, 33,17, 29,64, 29,63, 29,14, 27,09, 24,59, 22,83, 22,42.

HRMS: 561,2853 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_3]^+$  561,2821)

Chemický název: 1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-*N*-{5-[(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]pentyl}-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5k**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 25 % (234 mg)

Vzhled: hnědý prášek

Teplota tání: nestanoveno, amorfní pevná látka

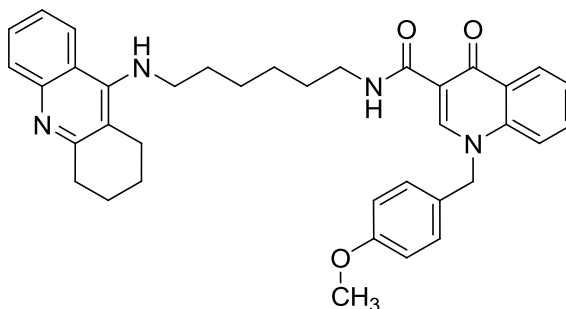
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,18 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 8,83 (s, 1H), 8,41 (dd,  $J = 8,1, 1,6$  Hz, 1H), 8,19 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 7,83 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,67–7,58 (m, 2H), 7,50 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 7,46–7,39 (m, 2H), 7,10–7,05 (m, 2H), 6,83–6,78 (m, 2H), 5,38 (s, 2H), 3,97–3,87 (m, 2H), 3,73 (s, 3H), 3,50 (q,  $J = 6,4$  Hz, 2H), 2,95 (t,  $J = 6,3$  Hz, 2H), 2,56 (t,  $J = 6,2$  Hz, 2H), 1,95–1,87 (m, 2H), 1,87–1,75 (m, 4H), 1,75–1,68 (m, 2H), 1,62–1,54 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,70, 165,20, 159,63, 156,14, 150,44, 148,04, 139,20, 138,24, 133,02, 133,00, 127,79, 127,73, 126,82, 125,93, 125,33, 125,22, 124,83, 119,74, 117,04, 115,44, 114,55, 111,55, 111,28, 57,12, 55,25, 48,50, 38,64, 30,06, 29,64, 28,96, 28,21, 23,91, 21,60, 20,48.

HRMS: 575,2955 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{36}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_3]^+$  575,2977)

Chemický název: 1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-*N*-{6-[(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]hexyl}-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**51**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 60 % (334 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 54,0–56,0 °C

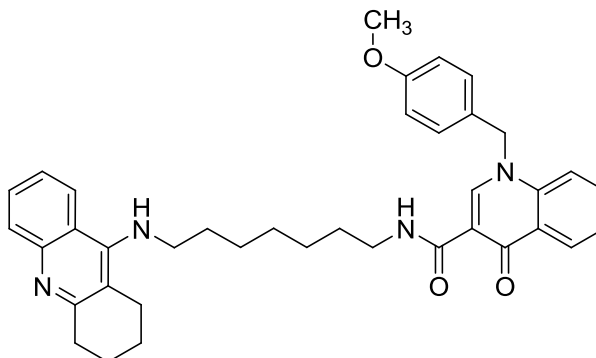
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,07 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,49 (dd,  $J = 8,1, 1,6$  Hz, 1H), 8,01–7,93 (m, 2H), 7,60 (ddd,  $J = 8,6, 7,0, 1,6$  Hz, 1H), 7,53 (ddd,  $J = 8,4, 6,8, 1,4$  Hz, 1H), 7,46–7,40 (m, 2H), 7,33 (ddd,  $J = 8,3, 6,8, 1,3$  Hz, 1H), 7,11–7,05 (m, 2H), 6,87–6,81 (m, 2H), 5,35 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,53 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 3,48 (td,  $J = 6,9, 5,7$  Hz, 2H), 3,09–3,04 (m, 2H), 2,72–2,65 (m, 2H), 1,94–1,86 (m, 4H), 1,75–1,63 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,75, 164,85, 159,64, 157,49, 151,20, 148,06, 146,33, 139,19, 132,69, 128,62, 127,99, 127,69, 127,60, 127,08, 125,89, 124,99, 123,67, 122,94, 119,61, 116,70, 115,15, 114,57, 111,97, 57,12, 55,22, 49,17, 38,90, 33,30, 31,46, 29,41, 26,69, 26,47, 24,57, 22,83, 22,45.

HRMS: 589,3111 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{37}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_3]^+$  589,3134)

Chemický název: 1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-*N*-{7-[(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]heptyl}-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5m**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 55 % (350 mg)

Vzhled: hnědý prášek

Teplota tání: nestanoveno, amorfní pevná látka

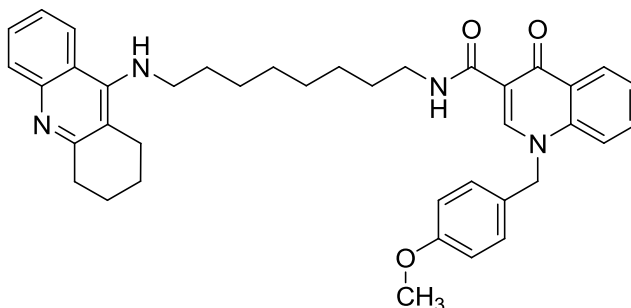
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,06 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 8,90 (s, 1H), 8,50 (dd,  $J = 8,1, 1,6$  Hz, 1H), 7,99 (dd,  $J = 8,5, 1,3$  Hz, 1H), 7,92 (dd,  $J = 8,5, 1,3$  Hz, 1H), 7,60 (ddd,  $J = 8,6, 7,0, 1,7$  Hz, 1H), 7,54 (ddd,  $J = 8,4, 6,8, 1,3$  Hz, 1H), 7,47–7,40 (m, 2H), 7,34 (ddd,  $J = 8,4, 6,8, 1,3$  Hz, 1H), 7,11–7,06 (m, 2H), 6,87–6,81 (m, 2H), 5,36 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,57–3,51 (m, 2H), 3,51–3,45 (m, 2H), 3,08–3,03 (m, 2H), 2,71–2,66 (m, 2H), 1,93–1,86 (m, 4H), 1,74–1,62 (m, 4H), 1,49–1,38 (m, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,76, 164,83, 159,64, 157,25, 151,43, 148,09, 146,14, 139,21, 132,69, 128,79, 128,01, 127,61, 127,38, 127,08, 125,92, 124,98, 123,72, 123,08, 119,49, 116,72, 115,05, 114,58, 112,01, 57,12, 55,22, 49,29, 39,07, 33,14, 31,48, 29,61, 29,42, 28,91, 26,86, 26,69, 24,49, 22,79, 22,41.

HRMS: 603,3281 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{38}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_3]^+$  603,3290)

Chemický název: 1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-*N*-{8-[(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]oktyl}-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5n**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 30 % (319 mg)

Vzhled: hnědý prášek

Teplota tání: nestanoveno, amorfní pevná látka

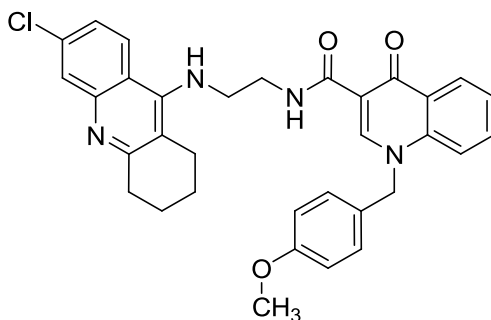
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,08–10,01 (m, 1H), 8,89 (t,  $J = 2,3$  Hz, 1H), 8,51–8,44 (m, 1H), 8,19–8,04 (m, 2H), 7,64–7,55 (m, 2H), 7,49–7,33 (m, 2H), 7,13–7,05 (m, 2H), 6,88–6,80 (m, 2H), 5,38 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,73–3,65 (m, 2H), 3,51–3,42 (m, 2H), 3,18–3,11 (m, 2H), 2,67–2,60 (m, 2H), 1,94–1,83 (m, 4H), 1,79–1,69 (m, 2H), 1,69–1,57 (m, 2H), 1,49–1,30 (m, 8H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,76, 164,82, 159,66, 153,10, 148,08, 139,21, 139,18, 132,72, 130,25, 127,99, 127,63, 127,04, 125,91, 125,00, 124,69, 124,28, 123,52, 117,88, 116,76, 114,58, 113,98, 112,01, 109,92, 57,15, 55,24, 53,37, 49,00, 39,08, 33,74, 31,84, 31,35, 31,28, 30,11, 29,61, 29,45, 29,27, 29,07, 28,96, 26,80, 26,60, 24,06, 22,61, 22,39, 21,64.

HRMS: 617,3458 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_3]^+$  617,3447)

Chemický název: *N*-{2-[(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]ethyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5o**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 31 % (203 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 162,5–164,0 °C

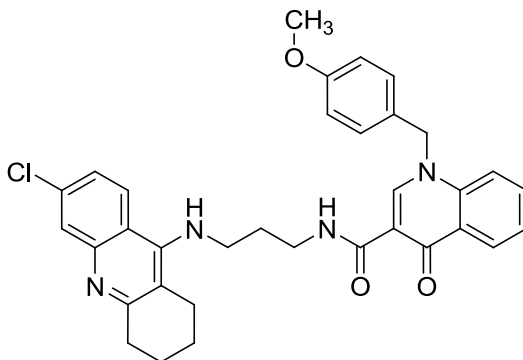
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,51–10,42 (m, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,50 (dd,  $J = 8,1, 1,5$  Hz, 1H), 8,02 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H), 7,89 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 7,64 (ddd,  $J = 8,7, 7,0, 1,6$  Hz, 1H), 7,51–7,43 (m, 2H), 7,24 (dd,  $J = 9,1, 2,2$  Hz, 1H), 7,15–7,08 (m, 2H), 6,91–6,85 (m, 2H), 5,42 (s, 2H), 3,83–3,78 (m, 4H), 3,78 (s, 3H), 3,02 (t,  $J = 5,9$  Hz, 2H), 2,79–2,73 (m, 2H), 1,92–1,83 (m, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,68, 166,66, 159,77, 158,97, 151,23, 148,11, 139,25, 134,17, 132,96, 127,97, 127,63, 127,22, 126,70, 125,73, 125,32, 124,53, 124,27, 117,98, 116,79, 115,53, 114,70, 111,29, 57,27, 55,28, 40,21, 36,81, 36,78, 25,02, 22,91, 22,45.

HRMS: 567,2146 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{33}\text{H}_{32}\text{ClN}_4\text{O}_3]^+$  567,2118)

Chemický název: *N*-{3-[(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]propyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5p**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 39 % (250 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 95,4–96,1 °C

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,26 (t,  $J = 6,3$  Hz, 1H), 8,92 (s, 1H), 8,51 (dd,  $J = 8,0, 1,6$  Hz, 1H), 8,03 (d,  $J = 9,1$  Hz, 1H), 7,90 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 7,63 (ddd,  $J = 8,6, 7,0, 1,6$  Hz, 1H), 7,50–7,43 (m, 2H), 7,29–7,22 (m, 1H), 7,14–7,07 (m, 2H), 6,91–6,82 (m, 2H), 5,43 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,67–3,55 (m, 4H), 3,03 (t,  $J = 6,2$  Hz, 2H), 2,75 (t,  $J = 5,2$  Hz, 2H), 1,95–1,84 (m, 6H).

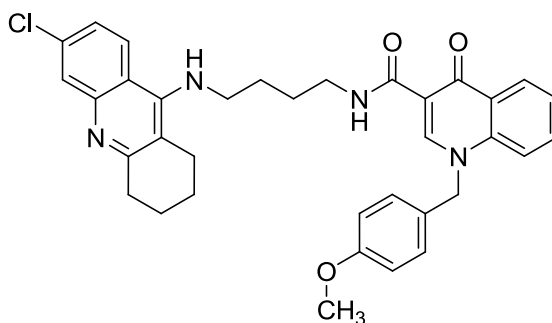
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,78, 165,93, 159,73, 151,21, 148,14, 139,25, 134,24, 132,91, 127,98, 127,79, 127,63, 127,15, 126,60, 125,79, 125,24, 124,45, 124,40, 118,15, 116,80, 115,77, 114,82, 114,66, 111,50, 57,27, 55,26, 45,19, 36,79, 36,76, 35,97, 31,58, 29,62, 24,97, 22,87, 22,43.

HRMS: 581,2294 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{ClN}_4\text{O}_3]^+$  581,2275)



Chemický název: *N*-{4-[(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]butyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5q**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 45 % (228 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 65,3–66,7 °C

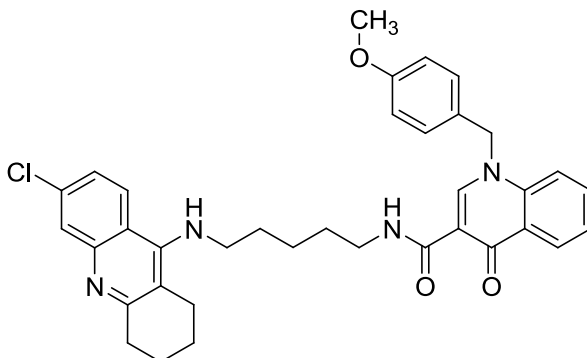
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,15 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,50 (dd, *J* = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 7,91 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,85 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 7,62 (ddd, *J* = 8,6, 7,0, 1,6 Hz, 1H), 7,49–7,42 (m, 2H), 7,24 (dd, *J* = 9,1, 2,2 Hz, 1H), 7,12–7,07 (m, 2H), 6,88–6,83 (m, 2H), 5,39 (s, 2H), 3,76 (s, 3H), 3,59–3,50 (m, 4H), 3,03–2,98 (m, 2H), 2,70–2,66 (m, 2H), 1,92–1,86 (m, 4H), 1,85–1,74 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176,75, 165,02, 159,69, 159,21, 150,75, 148,06, 147,73, 139,21, 133,97, 132,79, 127,98, 127,63, 127,18, 127,10, 125,85, 125,11, 124,57, 124,23, 118,25, 116,75, 115,73, 114,62, 111,82, 57,20, 55,24, 49,08, 38,69, 33,79, 29,20, 27,04, 24,55, 22,82, 22,50.

HRMS: 595,2412 (vypočítáno pro: [C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 595,2431)

Chemický název: *N*-{5-[(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]pentyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5r**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 52 % (483 mg)

Vzhled: hnědý prášek

Teplota tání: nestanoveno, amorfní pevná látka

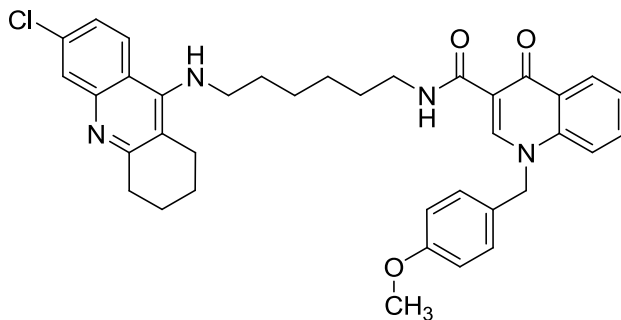
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,11 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 8,89 (s, 1H), 8,53–8,48 (m, 1H), 7,96–7,91 (m, 2H), 7,62 (ddd,  $J = 8,6, 7,0, 1,6$  Hz, 1H), 7,49–7,43 (m, 2H), 7,27–7,24 (m, 1H), 7,11–7,06 (m, 2H), 6,88–6,82 (m, 2H), 5,39 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,62–3,44 (m, 4H), 3,06–3,01 (m, 2H), 2,68–2,65 (m, 2H), 1,93–1,84 (m, 4H), 1,81–1,68 (m, 4H), 1,61–1,52 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,80, 165,00, 159,72, 151,22, 148,11, 139,24, 139,22, 132,80, 128,02, 127,64, 127,14, 125,87, 125,10, 124,69, 124,38, 116,77, 114,64, 114,01, 111,94, 57,22, 55,27, 49,27, 38,76, 36,82, 36,78, 31,22, 29,64, 29,61, 29,31, 29,28, 24,48, 24,29, 22,75, 22,35.

HRMS: 609,2593 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{ClN}_4\text{O}_3]^+$  609,2588)

Chemický název: *N*-{6-[(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]hexyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5s**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 80 % (434 mg)

Vzhled: hnědý prášek

Teplota tání: nestanoveno, amorfní pevná látka

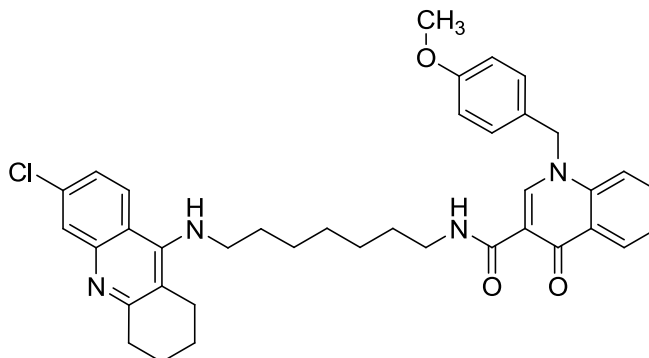
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,06 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,48 (dd,  $J = 8,1, 1,7$  Hz, 1H), 7,90 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H), 7,86 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 7,60 (ddd,  $J = 8,6, 7,0, 1,7$  Hz, 1H), 7,47–7,39 (m, 2H), 7,23 (dd,  $J = 9,0, 2,2$  Hz, 1H), 7,10–7,05 (m, 2H), 6,86–6,80 (m, 2H), 5,36 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,52–3,45 (m, 4H), 3,03–2,98 (m, 2H), 2,68–2,64 (m, 2H), 1,92–1,86 (m, 4H), 1,73–1,63 (m, 4H), 1,52–1,43 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,75, 164,85, 159,65, 159,04, 150,91, 148,06, 147,64, 139,19, 134,01, 132,71, 127,98, 127,60, 127,07, 125,88, 125,01, 124,62, 124,15, 118,12, 116,70, 115,43, 114,58, 111,97, 57,13, 55,22, 49,29, 38,87, 36,78, 33,71, 29,37, 26,65, 26,43, 24,47, 22,79, 22,47.

HRMS: 623,2768 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{ClN}_4\text{O}_3]^+$  623,2744)

Chemický název: *N*-{7-[(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]heptyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5t**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 40 % (192 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 82,0–84,7 °C

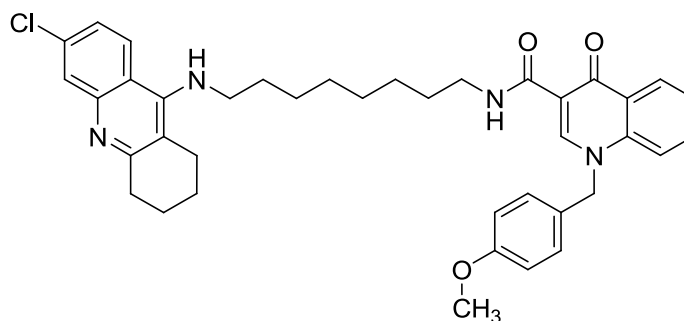
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,04 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 8,89 (s, 1H), 8,49 (dd,  $J = 8,1, 1,6$  Hz, 1H), 7,93–7,86 (m, 2H), 7,60 (ddd,  $J = 8,6, 7,0, 1,6$  Hz, 1H), 7,47–7,39 (m, 2H), 7,24 (dd,  $J = 9,0, 2,2$  Hz, 1H), 7,13–7,04 (m, 2H), 6,87–6,80 (m, 2H), 5,37 (s, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,52–3,43 (m, 4H), 3,04–2,98 (m, 2H), 2,66–2,64 (m, 2H), 1,94–1,85 (m, 4H), 1,73–1,60 (m, 4H), 1,51–1,37 (m, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176,83, 164,88, 159,71, 159,16, 150,98, 148,15, 147,78, 139,27, 134,07, 132,76, 128,07, 127,66, 127,21, 127,15, 125,96, 125,05, 124,68, 124,20, 118,21, 116,76, 115,47, 114,65, 112,08, 57,21, 55,28, 49,51, 39,12, 36,84, 36,81, 33,81, 31,63, 29,67, 29,46, 28,96, 26,91, 26,73, 24,53, 22,87, 22,56.

HRMS: 637,2887 (vypočítáno pro:  $[\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{ClN}_4\text{O}_3]^+$  637,2901)

Chemický název: *N*-{8-[(6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino]oktyl}-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxamid (**5u**)

Chemická struktura:



Výtěžek: 50 % (311 mg)

Vzhled: hnědé krystaly

Teplota tání: 54,6–56,7 °C

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,05 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,50 (dd, *J* = 8,1, 1,6 Hz, 1H), 7,90 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 7,88 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 7,64–7,58 (m, 1H), 7,43 (ddd, *J* = 8,1, 7,2, 6,1 Hz, 2H), 7,25 (dd, *J* = 9,1, 2,2 Hz, 1H), 7,12–7,07 (m, 2H), 6,88–6,82 (m, 2H), 5,38 (s, 2H), 3,77 (s, 3H), 3,51–3,44 (m, 4H), 3,05–2,99 (m, 2H), 2,69–2,64 (m, 2H), 1,93–1,88 (m, 4H), 1,70–1,61 (m, 4H), 1,48–1,30 (m, 8H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176,84, 164,88, 159,72, 159,36, 150,91, 148,19, 148,17, 139,27, 133,98, 132,75, 128,09, 127,67, 127,40, 127,21, 127,18, 125,98, 125,06, 124,66, 124,18, 118,32, 116,75, 114,66, 112,12, 57,22, 55,30, 49,62, 39,19, 36,85, 33,95, 31,72, 29,54, 29,15, 26,91, 24,54, 22,62.

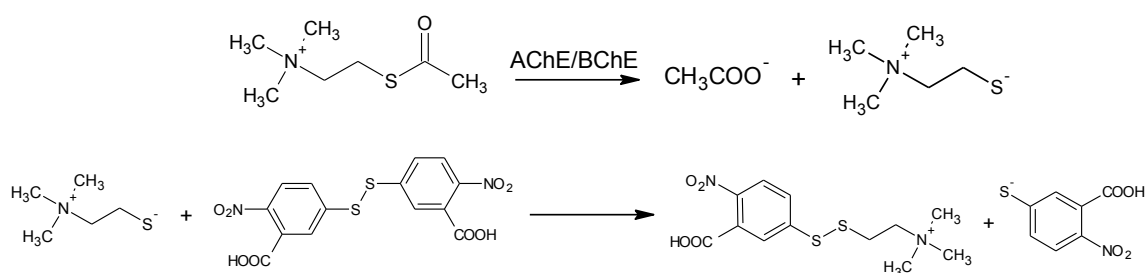
HRMS: 651,3081 (vypočítáno pro: [C<sub>39</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 651,3057)

## 4 Biologické testování

### 4.1 Ellmanova metoda

Inhibiční aktivita nových hybridních sloučenin byla stanovena pro lidskou rekombinantní AChE (*hAChE*; EC 3.1.1.7) a lidskou plazmatickou BChE (*hBChE*; EC 3.1.1.8) pomocí Ellmanovy metody.

Tato spektrofotometrická metoda je založena na principu, kdy AChE a BChE katalyzují hydrolyzu sulfanylových analogů acetylcholinu – acetylthiocholinu a butyrylthiocholinu. Hydrolyza vede ke vzniku acetátu či butyrátu a thiocholinu. Thiocholin v přítomnosti reaktivního Ellmanova činidla produkuje žlutě zbarvený anion (5-sulfanyl-2-nitrobenzoát); právě toto žluté zbarvení může být spektrofotometricky kvantifikováno (Schéma 6).<sup>56</sup>



**Schéma 6.** Princip Ellmanovy metody. Hydrolyza acetylthiocholinu cholinesterasami a následná reakce thiocholinu s DTNB za vzniku žlutě zbarveného 5-sulfanyl-2-nitrobenzoátu. Převzato z citace <sup>56</sup>.

Reagencií použitými při stanovení byly 5,5'-disulfandiylbis(2-nitrobenzoová kyselina) (Ellmanovo činidlo, DTNB), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, acetylthiocholin a butyrylthiocholin (Sigma-Aldrich, Česká republika). Měření bylo provedeno na spektrofotometru Multi-mode microplate reader Synergy 2 (Vermont, USA) s použitím polystyrenových Nunc 96-jamkových mikrotitračních destiček s plochým dnem (ThermoFisher Scientific, USA). Testování probíhalo v prostředí 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pufru s pH 7,4. Roztoky enzymů byly naředěny pufrům na aktivitu 2,0 U/ml. Testovací médium (100 μl) se skládalo z 40 μl 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,4), 20 μl 0,01 M DTNB, 10 μl enzymového roztoku, 20 μl 0,01 M substrátu (roztok jodidu acetylthiocholinu) a 10 μl příslušného inhibitoru. Zkušební roztoky s inhibitorem byly předem inkubovány 5 minut. Vlastní reakce byla zahájena okamžitým přidáním 20 μl

substrátu. Stanovení aktivity probíhalo měřením nárůstu absorpance ve dvouminutových intervalech při vlnové délce 412 nm a za teploty 37 °C. Každé měření bylo provedeno třikrát a výsledky byly zprůměrovány. *In vitro* testování inhibice hBChE bylo provedeno stejnou metodou. Pro vyhodnocení získaných dat byl v závěru použit software GraphPad Prism 5 (San Diego, USA).

## 4.2 Stanovení aktivity na M1 mAChRs

Aktivita nových hybridů byla stanovena měřením koncentrace intracelulárního vápníku za pomoci fluorescenčního indikátoru Fluo-4.

Fluo-4 představuje fluorescenční barvivo pro kvantifikaci buněčné koncentrace vápníku v rozsahu 100 nM až 1 μM, vykazuje vysokou emisi fluorescence a vysokou míru permeace buněk. Uvnitř zkoumané buňky váže volné vápenaté ionty a mění tak svou molekulární strukturu, kterou provází detekovatelná změna optických vlastností.<sup>57</sup>

Měření probíhalo dle standardních postupů.<sup>58</sup> K buněčné kultivaci byly použity ovariální buňky čínského křečka exprimující lidský rekombinantní M1 mAChRs (ATCC, USA). Kultivace probíhala v černých neprůhledných 96-jamkových destičkách s čirým dnem (Biotech, Česká republika). Ca<sup>2+</sup> influx byl měřen čtečkou destiček Synergy HT (Biotek, USA) při excitační a emisní vlnové délce 485/20 nm, respektive 528/20 nm. Pro generování výsledných dat byl použit GraphPad Prism 5.0 (San Diego, USA). Aktivita nových sloučenin byla porovnána s BQCA.

### 4.3 Výsledky testování

Inhibiční aktivita byla stanovena pro *hAChE* a *hBChE* a hodnoty vyjádřeny jako  $IC_{50}$ , tj. koncentrace, která je schopna snížit aktivitu cholinesteras o 50 %. U každé sloučeniny byla provedena tři nezávislá měření, z výsledných hodnot byl spočítán průměr a vyjádřen v  $\mu M \pm$  se standardní chybou průměru (SEM). Dále byl určen index selektivity (SI) udávající poměr  $IC_{50} hBChE/IC_{50} hAChE$ . Změřena byla i zjištěná inhibiční aktivita nových sloučenin na M1 subtypu mAChRs a analogicky vyjádřena jako  $IC_{50}$ . Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.

*Tabulka 1. Výsledky stanovení inhibiční aktivity. n. d. = neprovedeno.*

Sloučenina	Délka řetězce	<i>hAChE</i> $IC_{50} \pm$ SEM ( $\mu M$ )	<i>hBChE</i> $IC_{50} \pm$ SEM ( $\mu M$ )	SI ( <i>hBChE/hAChE</i> )	M1 $IC_{50} \pm$ SEM ( $\mu M$ )
<b>7-MEOTA (1)</b>	–	10 $\pm$ 1,0	17,6 $\pm$ 0,8	1,76	3,71 $\pm$ 0,16
<b>takrin (2)</b>	–	0,32 $\pm$ 0,013	0,0881 $\pm$ 0,0013	0,275	13 $\pm$ 13,0
<b>6-chlortakrin (3)</b>	–	0,0176 $\pm$ 0,0005	1,73 $\pm$ 0,10	98,3	6,09 $\pm$ 0,57
<b>BQCA</b>	–	>1000 $\pm$ 0	>1000 $\pm$ 0	n. d.	n. d.
<b>5a</b>	2	2,64 $\pm$ 0,14	0,408 $\pm$ 0,023	0,155	3,71 $\pm$ 0,31
<b>5b</b>	3	2,24 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,03	0,46	2,48 $\pm$ 0,24
<b>5c</b>	4	9,5 $\pm$ 0,89	1,08 $\pm$ 0,07	0,114	1,07 $\pm$ 0,26
<b>5d</b>	5	8,02 $\pm$ 0,90	6,16 $\pm$ 0,49	0,768	1,37 $\pm$ 0,18
<b>5e</b>	6	10,01 $\pm$ 1,407	16,6 $\pm$ 2,09	1,66	8,61 $\pm$ 1,40
<b>5f</b>	7	1,53 $\pm$ 0,16	49,3 $\pm$ 10,4	32,2	11,4 $\pm$ 3,06
<b>5g</b>	8	74,25 $\pm$ 17,16	12,4 $\pm$ 0,9	0,167	7,86 $\pm$ 0,84
<b>5h</b>	2	0,187 $\pm$ 0,007	0,0589 $\pm$ 0,0012	0,315	0,658 $\pm$ 0,087
<b>5i</b>	3	0,129 $\pm$ 0,004	0,674 $\pm$ 0,030	5,23	0,455 $\pm$ 0,061
<b>5j</b>	4	0,491 $\pm$ 0,027	1,32 $\pm$ 0,04	2,69	1,59 $\pm$ 0,19
<b>5k</b>	5	0,293 $\pm$ 0,015	0,823 $\pm$ 0,018	2,81	1,48 $\pm$ 0,14
<b>5l</b>	6	0,194 $\pm$ 0,007	0,28 $\pm$ 0,014	1,44	1,49 $\pm$ 0,11
<b>5m</b>	7	0,194 $\pm$ 0,008	1,19 $\pm$ 0,06	6,13	2,14 $\pm$ 0,27
<b>5n</b>	8	0,768 $\pm$ 0,041	1,28 $\pm$ 0,04	1,67	2,05 $\pm$ 0,14
<b>5o</b>	2	0,0745 $\pm$ 0,0031	0,0833 $\pm$ 0,0050	1,12	4,23 $\pm$ 0,66
<b>5p</b>	3	0,0419 $\pm$ 0,0011	3,72 $\pm$ 0,13	88,8	4,01 $\pm$ 0,26
<b>5q</b>	4	0,0896 $\pm$ 0,0029	3,12 $\pm$ 0,26	34,8	4,11 $\pm$ 0,31
<b>5r</b>	5	0,18 $\pm$ 0,011	7,74 $\pm$ 0,57	43	3,27 $\pm$ 0,22
<b>5s</b>	6	0,0941 $\pm$ 0,0040	13,4 $\pm$ 1,0	142	2,78 $\pm$ 0,30
<b>5t</b>	7	0,0517 $\pm$ 0,0034	3,34 $\pm$ 0,25	64,6	5,35 $\pm$ 0,63
<b>5u</b>	8	0,119 $\pm$ 0,007	37,2 $\pm$ 21,6	312	9,45 $\pm$ 0,76



## 5 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo připravit sérii nových hybridních molekul spojujících AChEIs s pozitivním alosterickým modulátorem M1 mAChRs – BQCA. Design těchto molekul byl navržen v souladu se strategií MTDLs. Jako AChEIs byly použity takrin (**2**) a jeho deriváty: 7-MEOTA (**1**) a 6-chlortakrin (**3**). Syntéza probíhala v několika krocích. Nejprve byla podle publikovaných postupů připravena molekula BQCA.<sup>55</sup> V následujících krocích byly opět podle již zveřejněných a ověřených postupů připraveny deriváty 9-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridinu (**3a–3c**), které byly substituovány 1, $\omega$ -alkandiaminem za vzniku *N*-( $\omega$ -aminoalkyl)takrinových derivátů (**4a–4u**).<sup>53,54</sup> Výsledkem finální syntézy je 21 nových sloučenin spojujících BQCA s THA (**5h–5n**), 7-MEOTA (**5a–5g**) a 6-chlortakrinem (**5o–5u**), jejichž biologická aktivita byla otestována a vyhodnocena.

Inhibiční aktivita nových hybridů (**5a–5u**) vůči ChEs byla stanovena Ellmanovou metodou, vyjádřena jako IC<sub>50</sub> a porovnána s inhibiční aktivitou sloučenin výchozích (**1**), (**2**), (**3**). Hodnoty IC<sub>50</sub> (**1**), (**2**), (**3**) korespondují s hodnotami uvedenými v předchozí studii.<sup>53</sup> Všechny nové deriváty prokázaly inhibiční schopnost vůči oběma ChEs v mikromolárním až submikromolárním rozsahu. Sloučeniny strukturně odvozené od 7-MEOTA (**5a–5g**) vykazaly nejnižší schopnost inhibice *hAChE* s mikromolárními hodnotami IC<sub>50</sub>. U hybridů odvozených od THA (**5h–5n**) byla oproti (**5a–5g**) prokázána vyšší inhibiční aktivita. Nejlepších výsledků inhibice *hAChE* bylo dosaženo u hybridů odvozených od 6-chlortakrinu (**5o–5u**).

Z řady (**5a–5g**) ukázala nejvyšší inhibiční schopnost **5f**; 6,5× vyšší než (**1**). Z řady (**5h–5n**) pak **5i** s inhibiční aktivitou 2,5× vyšší než (**2**). Z celé série prokázala nejvyšší inhibiční aktivitu sloučenina **5p** (IC<sub>50</sub> = 41,9 nM), jejíž schopnost inhibice *hAChE* je 238× vyšší než (**1**), 7× vyšší než (**2**), nicméně 2× nižší než (**3**). Nesubstituovaný 6-chlortakrin (**3**) tak zůstává nejsilnějším testovaným inhibitorem *hAChE*. Toto zjištění koreluje s výsledkem předchozí studie.<sup>53</sup> Ze studia vztahu struktury a účinku (SAR) vyplývá, že přítomnost atomu chloru na takrinovém skeletu zvyšuje inhibiční schopnost THA vůči AChE.

Stanovena byla také inhibiční aktivita vůči *hBChE*. Z každé řady byla určena sloučenina s nejvyšším inhibičním potenciálem; jednalo se o **5a**, **5h** a **5o**. Schopnost

inhibice *h*BChE byla u **5a** 43× vyšší než (**1**), u **5h** 1,5× vyšší oproti (**2**) a u **5o** 21× vyšší než (**3**). Pro inhibici *h*BChE tak byla vyhodnocena optimální délka spojovacího řetězce na dva uhlíky. Se zvyšujícím se počtem uhlíků spojovacího řetězce klesla aktivita o dva řády. Nejvyšší inhibiční schopnost vůči *h*BChE projevily deriváty THA (**5h–5n**), toto zjištění je v souladu s předchozími studiemi.<sup>59</sup> Deriváty (**5o–5u**) inhibovaly převážně *h*AChE, což lze vysvětlit přítomností atomu chloru v poloze 6 akridinového skeletu. Fakt, že tato substituce v poloze 6 snižuje inhibiční aktivitu vůči *h*BChE a naopak zvyšuje afinitu k *h*AChE, byl uveřejněn již dříve.<sup>60</sup>

U nově připravených (**5a–5u**) i výchozích (**1**), (**2**), (**3**) sloučenin byla testována schopnost modulovat M1 mAChRs. Pozorovaná aktivita byla srovnána s aktivitou BQCA. Navzdory očekávání výsledky stanovení ukázaly, že ačkoliv afinita k receptoru byla zachována, nové sloučeniny nepůsobí zamýšlenou potenciací M1 mAChRs, ale naopak jejich inhibici (antagonistický efekt). To lze vysvětlit pravděpodobnou převažující orientací takrinové části na M1 receptor. Inhibiční aktivita (**5a–5u**) na M1 mAChRs byla změřena a vyjádřena jako IC<sub>50</sub>. Hodnoty IC<sub>50</sub> se pohybovaly v řádech mikromolů, pouze sloučeniny **5h** a **5i** inhibovaly M1 mAChRs v nanomolárních hodnotách (IC<sub>50</sub> = 0,658 a 0,455 μM). Nejslaběji inhibovala M1 mAChRs sloučenina **5f** (IC<sub>50</sub> = 11,4 μM). Obecně lze konstatovat, že se zvyšující se délkou spojovacího řetězce nových hybridů souvisí nižší schopnost inhibice M1 mAChRs.

K celkovému hodnocení série nově připravených sloučenin lze uvést, že hybridizace vedla u vybraných sloučenin ke zvýšení inhibice AChE, ale u všech nových sloučenin pravděpodobně způsobila nežádoucí inverzi účinku na M1 mAChRs. Tyto poznatky budou zohledněny v dalším výzkumu MTDLs.

## 6 Závěr

V rámci diplomové práce bylo v souladu se strategií MTDLs připraveno 21 nových hybridních molekul kombinujících BQCA s THA, 7-MEOTA a 6-chlortakrinem pomocí spojovacího řetězce o počtu 2–8 uhlíků. Inhibiční aktivita těchto nových molekul vůči *hAChE* a *hBChE* byla testována *in vitro* pomocí Ellmanovy kolorimetrické metody, výsledky měření byly vyjádřeny jako  $IC_{50}$  a porovnány s  $IC_{50}$  molekul výchozích – THA, 7-MEOTA a 6-chlortakrinem. Sloučeniny vykázaly inhibiční potenciál vůči AChE/BChE v řádech mikromolárních a submikromolárních hodnot  $IC_{50}$ . Aktivita na M1 mAChRs byla určena měřením koncentrace intracelulárního vápníku, z něhož vyplynulo, že nové hybridy působí na mAChRs antagonisticky. Inhibiční aktivita vůči mAChRs byla u jednotlivých molekul změřena, vyjádřena jako  $IC_{50}$  a byly zaznamenány její změny v závislosti na délce spojovacího řetězce.

## 7 Seznam citované literatury

- (1) Cummings, J. L. Drug Therapy – Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351* (1), 56–67.
- (2) De-Paula, V. J.; Radanovic, M.; Diniz, B. S.; Forlenza, O. V. Alzheimer’s Disease. *Subcell. Biochem.* **2012**, *65*, 329–352.
- (3) Goedert, M.; Spillantini, M. G. A Century of Alzheimer’s Disease. *Science* **2006**, *314* (5800), 777–781.
- (4) Kalvach, Z.; Zadák, Z.; Jiráček, R.; Závazalová, H.; Sucharda P. et al. *Geriatric a gerontologie*. 1. vyd., Grada, Praha 2004. ISBN 80-247-0548-6
- (5) Steele, C.; Rovner, B.; Chase, G. A.; Folstein, M. Psychiatric Symptoms and Nursing Home Placement of Patients with Alzheimer’s Disease. *Am. J. Psychiatry* **1990**, *147* (8), 1049–1051.
- (6) Castellani, R. J.; Rolston, R. K.; Smith, M. A. Alzheimer Disease. *Dis.-Mon. DM* **2010**, *56* (9), 484.
- (7) Reitz, C.; Brayne, C.; Mayeux, R. Epidemiology of Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2011**, *7* (3), 137–152.
- (8) Hickman, R. A.; Faustin, A.; Wisniewski, T. Alzheimer Disease and Its Growing Epidemic: Risk Factors, Biomarkers, and the Urgent Need for Therapeutics. *Neurol. Clin.* **2016**, *34* (4), 941–953.
- (9) Česká Alzheimerovská Společnost. Výskyt demence. [cit. 2016-12-03]; dostupné z <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/vyskyt-demence/>
- (10) Alzheimer’s Association. 2013 Alzheimer’s Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **2013**, *9* (2), 208–245.
- (11) Turner, R. S. Alzheimer’s Disease. *Semin. Neurol.* **2006**, *26* (5), 499–506.
- (12) Blennow, K.; Leon, M. J. de; Zetterberg, H. Alzheimer’s Disease. *The Lancet* **2006**, *368* (9533), 387–403.
- (13) Budson, A. E.; Solomon, P. R. New Diagnostic Criteria for Alzheimer’s Disease and Mild Cognitive Impairment for the Practical Neurologist. *Pract. Neurol.* **2012**, *12* (2), 88–96.
- (14) DeKosky, S. Epidemiology and Pathophysiology of Alzheimer’s Disease. *Clin. Cornerstone* **2000**, *3* (4), 15–26.

- (15) Silvestrelli, G.; Lanari, A.; Parnetti, L.; Tomassoni, D.; Amenta, F. Treatment of Alzheimer's Disease: From Pharmacology to a Better Understanding of Disease Pathophysiology. *Mech. Ageing Dev.* **2006**, *127* (2), 148–157.
- (16) Barage, S. H.; Sonawane, K. D. Amyloid Cascade Hypothesis: Pathogenesis and Therapeutic Strategies in Alzheimer's Disease. *Neuropeptides* **2015**, *52*, 1–18.
- (17) Imbimbo, B. P.; Lombard, J.; Pomara, N. Pathophysiology of Alzheimer's Disease. *Neuroimaging Clin. N. Am.* **2005**, *15* (4), 727–753.
- (18) Vassar, R. BACE1 Inhibitor Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease. *Alzheimers Res. Ther.* **2014**, *6* (9), 89.
- (19) Lessard, C. B.; Cottrell, B. A.; Maruyama, H.; Suresh, S.; Golde, T. E.; Koo, E. H.  $\gamma$ -Secretase Modulators and A $\beta$ 1 Isoforms Modulate  $\gamma$ -Secretase Cleavage but Not Position of  $\epsilon$ -Cleavage of the Amyloid Precursor Protein (APP). *PLoS One* **2015**, *10* (12), e0144758.
- (20) Hardy, J.; Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* **2002**, *297* (5580), 353–356.
- (21) Liu, C.-C.; Liu, C.-C.; Kanekiyo, T.; Xu, H.; Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Risk, Mechanisms and Therapy. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, *9* (2), 106–118.
- (22) Patterson, C.; Feightner, J. W.; Garcia, A.; Hsiung, G.-Y. R.; MacKnight, C.; Sadochnik, A. D. Diagnosis and Treatment of Dementia: 1. Risk Assessment and Primary Prevention of Alzheimer Disease. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* **2008**, *178* (5), 548–556.
- (23) Demetrius, L. A.; Magistretti, P. J.; Pellerin, L. Alzheimer's Disease: The Amyloid Hypothesis and the Inverse Warburg Effect. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 522.
- (24) Avila, J.; Lucas, J. J.; Perez, M.; Hernandez, F. Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiol. Rev.* **2004**, *84* (2), 361–384.
- (25) Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2* (7), a006247.
- (26) Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362* (4), 329–344.
- (27) Iqbal, K.; Liu, F.; Gong, C.-X. Tau and Neurodegenerative Disease: The Story so Far. *Nat. Rev. Neurol.* **2016**, *12* (1), 15–27.

- (28) Terry, A. V.; Buccafusco, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306* (3), 821–827.
- (29) Craig, L. A.; Hong, N. S.; McDonald, R. J. Revisiting the Cholinergic Hypothesis in the Development of Alzheimer's Disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2011**, *35* (6), 1397–1409.
- (30) de la Torre, J. C. Three Postulates to Help Identify the Cause of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2011**, *24* (4), 657–668.
- (31) Ferreira-Vieira, T. H.; Guimaraes, I. M.; Silva, F. R.; Ribeiro, F. M. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* **2016**, *14* (1), 101–115.
- (32) Silbernagl, S.; Despopoulos, A. *Atlas fyziologie člověka: překlad 8. německého vydání*. 4. české vyd., Grada, Praha 2016. ISBN 978-80-247-4271-7
- (33) Mendiola-Precoma, J.; Berumen, L. C.; Padilla, K.; Garcia-Alcocer, G. Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 2589276.
- (34) Greenough, M. A.; Camakaris, J.; Bush, A. I. Metal Dyshomeostasis and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Neurochem. Int.* **2013**, *62* (5), 540–555.
- (35) Leszek, J.; Trypka, E.; Tarasov, V. V.; Md Ashraf, G.; Aliev, G. Type 3 Diabetes Mellitus: A Novel Implication of Alzheimer Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**.
- (36) Itzhaki, R. F.; Lathe, R.; Balin, B. J.; Ball, M. J.; Bearer, E. L.; Braak, H.; Bullido, M. J.; Carter, C.; Clerici, M.; Cosby, S. L.; Del Tredici, K.; Field, H.; Fulop, T.; Grassi, C.; Griffin, W. S. T.; Haas, J.; Hudson, A. P.; Kamer, A. R.; Kell, D. B.; Licastro, F.; Letenneur, L.; Lövhelm, H.; Mancuso, R.; Miklossy, J.; Otth, C.; Palamara, A. T.; Perry, G.; Preston, C.; Pretorius, E.; Strandberg, T.; Tabet, N.; Taylor-Robinson, S. D.; Whittum-Hudson, J. A. Microbes and Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *51* (4), 979–984.
- (37) de los Ríos, C. Cholinesterase Inhibitors: A Patent Review (2007 - 2011). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22* (8), 853–869.
- (38) Pohanka, M. Acetylcholinesterase Inhibitors: A Patent Review (2008 - Present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22* (8), 871–886.

- (39) Colovic, M. B.; Krstic, D. Z.; Lazarevic-Pasti, T. D.; Bondzic, A. M.; Vasic, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **2013**, *11* (3), 315–335.
- (40) Chen, X.; Wehle, S.; Kuzmanovic, N.; Merget, B.; Holzgrabe, U.; König, B.; Sotriffer, C. A.; Decker, M. Acetylcholinesterase Inhibitors with Photoswitchable Inhibition of  $\beta$ -Amyloid Aggregation. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5* (5), 377–389.
- (41) Singh, M.; Kaur, M.; Kukreja, H.; Chugh, R.; Silakari, O.; Singh, D. Acetylcholinesterase Inhibitors as Alzheimer Therapy: From Nerve Toxins to Neuroprotection. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 165–188.
- (42) Pohanka, M. Cholinesterases, a Target of Pharmacology and Toxicology. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* **2011**, *155* (3), 219–229.
- (43) Anand, P.; Singh, B. A Review on Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Arch. Pharm. Res.* **2013**, *36* (4), 375–399.
- (44) Zemek, F.; Drtinova, L.; Nepovimova, E.; Sepsova, V.; Korabecny, J.; Klimes, J.; Kuca, K. Outcomes of Alzheimer's Disease Therapy with Acetylcholinesterase Inhibitors and Memantine. *Expert Opin. Drug Saf.* **2014**, *13* (6), 759–774.
- (45) Soukup, O.; Jun, D.; Zdarova-Karasova, J.; Patocka, J.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Sepsova, V.; Mandikova, J.; Trejtnar, F.; Pohanka, M.; Drtinova, L.; Pavlik, M.; Tobin, G.; Kuca, K. A Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine. *Curr. Alzheimer Res.* **2013**, *10* (8), 893–906.
- (46) Spilovska, K.; Korabecny, J.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Mezeiova, E.; Soukup, O.; Kuca, K. Multitarget Tacrine Hybrids with Neuroprotective Properties to Confront Alzheimer's Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (9), 1006–1026.
- (47) Parsons, C. G.; Danysz, W.; Dekundy, A.; Pulte, I. Memantine and Cholinesterase Inhibitors: Complementary Mechanisms in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurotox. Res.* **2013**, *24* (3), 358–369.
- (48) Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Recanatini, M.; Melchiorre, C. Multi-Target-Directed Ligands to Combat Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 347–372.
- (49) Michalska, P.; Buendia, I.; Del Barrio, L.; Leon, R. Novel Multitarget Hybrid Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (9), 1027–1043.

- (50) Jiang, S.; Li, Y.; Zhang, C.; Zhao, Y.; Bu, G.; Xu, H.; Zhang, Y.-W. M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor in Alzheimer's Disease. *Neurosci. Bull.* **2014**, *30* (2), 295–307.
- (51) Decker, M.; Holzgrabe, U. M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Allosteric Modulators as Potential Therapeutic Opportunities for Treating Alzheimer's Disease. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3* (7), 752–762.
- (52) Fang, L.; Jumpertz, S.; Zhang, Y.; Appenroth, D.; Fleck, C.; Mohr, K.; Tränkle, C.; Decker, M. Hybrid Molecules from Xanomeline and Tacrine: Enhanced Tacrine Actions on Cholinesterases and Muscarinic M1 Receptors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (5), 2094–2103.
- (53) Nepovimova, E.; Korabecny, J.; Dolezal, R.; Babkova, K.; Ondrejicek, A.; Jun, D.; Sepsova, V.; Horova, A.; Hrabinoval, M.; Soukup, O.; Bukum, N.; Jost, P.; Muckova, L.; Kassa, J.; Malinak, D.; Andrs, M.; Kuca, K. Tacrine-Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (22), 8985–9003.
- (54) Spilovska, K.; Korabecny, J.; Kral, J.; Horova, A.; Musilek, K.; Soukup, O.; Drtinova, L.; Gazova, Z.; Siposova, K.; Kuca, K. 7-Methoxytacrine-Adamantylamine Heterodimers as Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease Treatment--Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies. *Mol. Basel Switz.* **2013**, *18* (2), 2397–2418.
- (55) Amarante, G. W.; Benassi, M.; Pascoal, R. N.; Eberlin, M. N.; Coelho, F. Mechanism and synthesis of pharmacologically active quinolones from Morita-Baylis-Hillman adducts. *Tetrahedron* **2010**, *66*(24), 4370-4376.
- (56) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Feather-Stone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- (57) Gee, K. R.; Brown, K. A.; Chen, W. N.; Bishop-Stewart, J.; Gray, D.; Johnson, I. Chemical and Physiological Characterization of Fluo-4 Ca(2+)-Indicator Dyes. *Cell Calcium* **2000**, *27* (2), 97–106.
- (58) Watt, M. L.; Schober, D. A.; Hitchcock, S.; Liu, B.; Chesterfield, A. K.; McKinzie, D.; Felder, C. C. Pharmacological Characterization of LY593093, an M1



- Muscarinic Acetylcholine Receptor-Selective Partial Orthosteric Agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, 338 (2), 622–632.
- (59) Nepovimova, E.; Uliassi, E.; Korabecny, J.; Peña-Altamira, L. E.; Samez, S.; Pesaresi, A.; Garcia, G. E.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bergamini, C.; Fato, R.; Lamba, D.; Roberti, M.; Kuca, K.; Monti, B.; Bolognesi, M. L. Multitarget Drug Design Strategy: Quinone-Tacrine Hybrids Designed to Block Amyloid- $\beta$  Aggregation and to Exert Anticholinesterase and Antioxidant Effects. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (20), 8576–8589.
- (60) Munoz-Ruiz, P.; Rubio, L.; Garcia-Palomero, E.; Dorronsoro, I.; del Monte-Millan, M.; Valenzuela, R.; Usan, P.; de Austria, C.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J.; Medina, M.; Martinez, A. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors: New Disease-Modifying Agents for Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (23), 7223–7233.